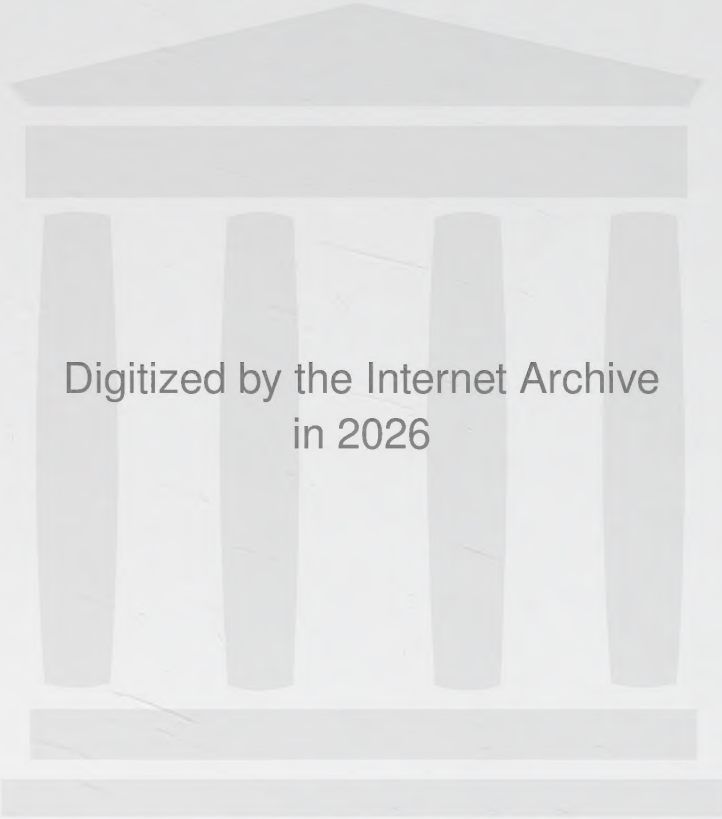


**UNTERSUCHUNGEN AN HYPOSPADIE-PATIENTEN
ÜBER DIE HÄUFIGKEIT DES
3 β -ol-DEHYDROGENASE- Δ 4,5-ISOMERASE-
DEFEKTES**

Siegfried G. Stippig

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555616_0061

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus B e t k e

UNTERSUCHUNGEN AN HYPOSPADIE-PATIENTEN
ÜBER DIE HÄUFIGKEIT DES
3 β -ol-DEHYDROGENASE- Δ ⁴,5-ISOMERASE-
DEFEKTES



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Siegfried G. STIPPIG
1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. D.KNORR
Mitberichterstatter:	Prof. Dr.med. K.BETKE
Dekan:	Prof. Dr.med. W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 1977



Meinen Eltern

V o r w o r t

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1973 bis 1975 an der Endokrinologischen Abteilung der Universitätskinderklinik München.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Betke , Direktor der Kinderklinik der Universität München, spreche ich für die freundliche Aufnahme im Hause und die Überlassung des Arbeitsplatzes aufrichtigen Dank aus.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dietrich Knorr für die Vergabe des Themas, für die jahrelange Betreuung und fachliche Leitung, die diese Arbeit ermöglichte , und für das entgegengebrachte Vertrauen und Verständnis.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Assistentinnen des Hormonlabors, im besondern Frau Regina Ehrt und Frau Ingeborg Stoll, für die herzliche Aufnahme, für den unermüdlichen Einsatz und für manch tröstendes Wort.

Meiner Verlobten, Fräulein Margarete Zierl, danke ich an dieser Stelle herzlich für ihre Geduld und ihren Fleiß bei der Anfertigung der umfangreichen Schreibarbeiten .

INHALT:

1.0	<u>EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNG</u>	Seite 1
1.1	Einleitung	Seite 1
1.1.1	Definition der Hypospadie	
1.1.2	Veranlassung zur Studie	
1.1.3	Definition des 3 β -ol-Dehydro- genase-Isomerase Defektes	
1.1.4	Häufigkeit des Defektes	
1.2	Beschreibung des Enzymdefektes	Seite 2
1.2.1	Biosynthese der Steroidhormone	
1.2.2	Nachweis des Defektes	
1.2.3	Lage des Defektes innerhalb der Steroidbiosynthese	
1.2.4	Auswirkungen des Defektes	
1.3	Klinisches Material	Seite 6
1.3.1	Kollektiv der Hypospadie-Patienten	
1.3.2	Kontroll-Kollektiv	
1.4	Fragestellung	Seite 8
2.0	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	Seite 9
2.1	Materialien zur gaschromatographischen Bestimmung von Steroidhormonen im Urin	Seite 9
2.1.1	Reagenzien und Lösungen	
2.1.2	Geräte	
2.1.3	Gase	
2.2	Darstellung eines Analysenganges für Androsteron, Ätiocholanolon, DHA, Pregnentriol und 11-Keto-Androsteron	Seite 12
2.2.1	Sammeln eines 24-Std.-Urins	
2.2.2	Hydrolyse	
2.2.3	Extraktion	
2.2.4	Fraktionierung der einzelnen Steroide	
2.2.5	Silylierung	

2.2.6	Gaschromatographische Präparation des Substanzgemisches	
2.2.7	Referenzsubstanzen	
2.3	Besprechung eines Gaschromatogramms	Seite 17
2.3.1	Versuchsbedingungen der Gas- chromatographie	
2.3.2	Erläuterung eines Chromatogramms	
2.3.3	Auswertung der Chromatogramme	
2.4	Besprechung verschiedener Tests	Seite 21
2.4.1	HCG-Test	
2.4.2	Synacthen ^R -Test	
2.5	Aussagekraft der Ergebnisse	Seite 23
2.5.1	Genauigkeit	
2.5.2	Richtigkeit	
2.5.3	Spezifität	
3.0	<u>UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE</u>	Seite 27
3.1	Aufarbeitung der Ergebnisse	Seite 27
3.1.1	Auswahl des Patientenkollektivs	
3.1.2	Notwendigkeit eines Normalkollektivs	
3.1.3	Einteilung in homogene Klassen	
3.1.4	Gebrauch des Zentralwertes	
3.2	Harnsteroido des Normalkollektivs	Seite 31
3.2.1	Meßwertdarstellung	
3.2.2	Vergleichswerte anderer Autoren	
3.2.3	Wertung der Daten	
3.2.3.1	Androsteron	
3.2.3.2	Aetiocholanolon	
3.2.3.3	Dehydroepiandrosteron	
3.2.3.4	Pregnentriol	
3.2.4	Ergebnis der Untersuchungen	

3.3	Harnsteroido des Hypospadiakollektivs	Seite 36
3.3.1	Meßwertdarstellung	
3.3.2	Wertung der Daten	
3.3.2.1	Wertung der Hormonmetaboliten in Altersklasse I	
3.3.2.2	Wertung der Ergebnisse in Altersklasse II	
3.3.2.3	Wertung der Ergebnisse in Altersklasse III	
3.3.2.4	Wertung der Ergebnisse in Altersklasse IV	
3.3.3	Zusammenfassende Betrachtung	
3.4	Das Verhalten der gesuchten Harnsteroido nach Stimulation mit HCG und Synacthen	Seite 42
3.4.1	Begründung und Durchführung der Stimulationsversuche	
3.4.2	Meßwertdarstellung	
3.4.3	Wertung der Befunde und Vergleichsdaten	
4.0	<u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	Seite 47
5.0	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	Seite 51
6.0	<u>ANHANG</u>	Seite 52
7.0	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	Seite 58

1.1.1 Hypospadie ist eine Mißbildung des äußeren Genitale. Sie ist durch drei Merkmale gekennzeichnet:

1. dystope Harnröhrenmündung
2. Schaftkrümmung des Penis zur Urethral- bzw. Skrotalseite hin
3. dorsal überschüssige Vorhaut

1.1.2 In den letzten Jahren kamen im Mittel bis zu 50 Hypospadie-Patienten auf Grund ihrer Störungen in der Univ.-Kinderklinik zur Operation. Sie liefen alle unter der Diagnose: idiopathische Hypospadie.

Nach LEIBER, OLBRICH (29) tritt Hypospadie bei 32 klinischen Syndromen mit verschiedenen Ätiologien in Erscheinung; vorwiegend können genetische Faktoren verantwortlich gemacht werden, die eine Störung innerhalb der Sexualhormone bewirken, welche die Entwicklung und die Funktion der äußeren und inneren Genitalorgane kontrollieren. Da in der Univ.-Kinderklinik schon seit Jahren Steroidhormon-Studien betrieben wurden, war es naheliegend, in dieser Richtung nach möglichen Ursachen für das Entstehen einer Hypospadie zu suchen.

1973 zeigte KNORR et al. (24), daß der Defekt einer 17 β -Hydroxysteroidreduktase als Ursache für eine Hypospadie angenommen werden kann. Angeregt durch dieses Erkenntnis, die in der Univ.-Kinderklinik gewonnen worden war, wurde ein Kollektiv von Hypospadie - Patienten auf die Häufigkeit des 3 β -ol-Dehydrogenase-Isomerase Defektes hin untersucht, den BONGIOVANNI (4) 1962 als mögliche Ursache für eine Hypospadie beschrieben hatte.

1.1.3 Klinisch zeigt der 3 β -ol-Dehydrogenase - Δ 4,5-Isomerase-Defekt drei auffallende Befunde:

1. Pseudohermaphroditismus masculinus bei Knaben
2. Salz Verlust
3. autosomal recessives Erbbild, sofern keine Spontanmutation vorliegt.

Laborbefunde (19) zeigen deutlich erhöhte Urinausscheidungen für

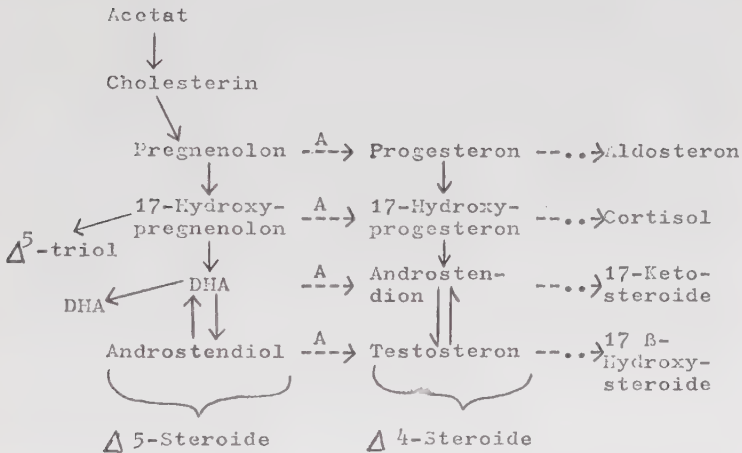
1. Dehydroepiandrosteron=3 β -Hydroxyandrost-5en-17on
2. Pregnenatriol=5-Pregnene-3 β ,17 α , 20 α -triol

1.1.4 Dieser Enzymdefekt ist selten. Bisher sind vierzehn Fälle dieser Art beschrieben worden (20).

1.2.1 Zum besseren Verständnis werden kurz notwendige Fakten dargestellt. Die Biosynthese der Steroidhormone führt über das Cholesterin und wurde mittels radioaktiv markiertem Cholesterin bewiesen. Der Umbau des Cholesterins zu den Steroidhormonen wird durch eine Reihe von stereospezifischen Enzymen gesteuert. Der erste Schritt führt unter oxidativer Seitenkettenabspaltung zum Pregnenolon. Der nächste Schritt stellt die Umwandlung von Δ^5 -Pregnenolon in Progesteron dar. An dieser Überführung ist das 3 β -HSD-System (=3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase- Δ^4 - Δ^5 -Isomerase) beteiligt. Zunächst wird die 3 β -Hydroxygruppe durch die 3 β -ol-Dehydrogenase zur 3-Ketogruppe dehydriert. In einer zweiten Reaktion verschiebt sich die Doppelbindung unter Beteiligung einer Isomerase, und aus der Pregnan - Struktur entsteht die Pregnen - Struktur. Ein Nebenweg läuft über die 17 α -Hydroxylierung zum 17- α -Hydroxypregnenolon und mittels der 3 β -Hydroxysteroid - Dehydrogenase zum 17- α -Hydroxyprogesteron. 17- α -Hydroxypregnenolon erleidet ferner unter Einfluß der Desmolase Abbau zu DHA, welches zu einem großen Teil als Sulfat ausgeschieden wird, zu einem geringeren Teil noch in Androstendiol übergeht. Mittels der 3 β -HSD entsteht daraus Testosteron.

Schema der Steroidhormonsynthese

(modifiziert nach R.L.ROSENFELD)



A: 3 β -ol-Dehydrogenase-Isomerase-System

3 β -HSD-Defekt=Insuffizienz der Cortisol-,Aldosteron-
und Androgensynthese,
bei Mädchen leichte Virilisierung
wegen der stark vermehrten Produktion
des schwach androgen wirkenden DHA.

1.2.2 Es ist die Absicht dieser Einführung, die wesentlichen klinischen Befunde, einzelne methodologische Aspekte und die gegenwärtig sicheren klinischen Zusammenhänge aufzuzeigen.

Ein direkter Nachweis eines Enzymdefektes der Steroidbiosynthese ist selten möglich, weil vom Patienten mit dieser Störung das zum Nachweis notwendige Gewebe (NNR, Testis) nicht gewonnen werden kann. Der Beweis wird indirekt geführt und stützt sich auf den Nachweis von deutlich erhöhten Steroidmetaboliten im Harn. Die Anhäufung dieser Steroide schafft den Zugang zur Lage des Defektes innerhalb der Steroidbiosynthese, was als indirekter Nachweis für die mangelhafte enzymatische Umsetzung angesehen werden kann. Ein partieller Defekt der 3β -HSD ist durch die Anhäufung der Steroidverbindungen mit $\Delta^{5,3}\beta$ -ol-Konfiguration gekennzeichnet. Sie sind die Vorstufen für diese enzymatische Reaktion, deren Produkte völlig fehlen oder nur mangelhaft vorhanden sein können.

1.2.3 Bei einem Defekt des 3β -ol-Dehydrogenasen- und $\Delta^{4,5}$ -Isomerasensystems fehlt die enzymatische Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron und andere $\Delta^{4,5}$ -Ketosteroide. Hierbei ist also nicht nur die Synthese des Cortisols, sondern auch die von Testosteron, Androsteron, Aldosteron und der Östrogene stark eingeschränkt. Beim vollständigen Enzymausfall führt der Aldosteronmangel zum Salzverlustsyndrom und zur Hyperkaliämie. Die meisten Kinder der berichteten Fälle starben im frühen Kleinkindalter an Salzverlust-Krisen (4) und vermutlich nur jene mit einem Mangel an 3β -HSD erreichten das Pubertätsalter (4, 19, 22, 40). Die Synthese der Sexualsteroiden bleibt auf der Stufe des Dehydroepiandrosterons stehen. Dieses kann aufgrund des gleichen Enzymdefektes nicht in Androstendion, Testosteron oder Östrogene

umgewandelt werden. Folglich kommt es zur Akkumulation von DHA und dessen Abbauprodukten, dessen erhöhte Ausscheidung im Harn in der Fraktion der neutralen 17 -Ketosteroide nachgewiesen werden kann. Da bei diesem Defekt auch der Syntheseweg vor dem 17 α -Hydroxyprogesteron gestört ist und somit die Bildung von Aldosteron und 11-Desoxykortikosteron blockiert ist, wird das klinische Bild zwar durch Salzverlustsyndrom kompliziert und findet sich im Gegensatz zu anderen Formen des AGS keine erhöhte Harnausscheidung von Pregnantriol.

1.2.4 Bei dem vermehrt gebildeten C 19-Steroid Dehydroepiandrosteron handelt es sich um eine nur schwach androgen wirkende Substanz, die bei Mädchen mäßige Virilisierungserscheinungen bewirkt, die aber nicht so stark ausgeprägt sind wie beim 21- und beim 11-Hydroxylase-Defekt. Knaben zeigen ein intersexuelles äußeres Genitale mit Hypospadie, was für einen Ausfall der 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nicht nur in der NNR, sondern auch in den Testes spricht. Bei diesem Enzymdefekt liegen die Steroide im Harn (4) in der 3 β -ol- Δ 5-Konfiguration vor. Bevorzugt werden Δ 5-Pregnenetriol und DHA ausgeschieden (19,40). Es sind einzelne Fälle (19,22,40) beschrieben worden, bei denen eine erhöhte Ausscheidung von Δ 5-Pregnenetriol auf einen Defekt der 3 β -HSD hinwies, bei denen aber unerwartet etwas Androsteron und Pregnantriol im Urin nachgewiesen wurden. Es wird angenommen, daß in diesen Fällen die 3 β -HSD in der Leber (1) intakt war und die Umwandlung von Δ 5-Steroiden in Δ 4,3-Ketosteroide ermöglichte. Das Vorkommen von Androsteron, Ätiocholanolon und Pregnantriol schließt demnach einen Defekt der 3 β -HSD in der NNR und in den Testes nicht aus. In solchen Fällen wird von einem partiellen Defekt der 3 β -ol-Dehydrogenase- Δ 4,5-Isomerase gesprochen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der 3 β -HSD-Defekt bei beiden Geschlechtern vorkommt. Das klinische Bild weist auf eine unvollständige fetale testikuläre Funktion hin, die für die embryonale männliche Entwicklung unzureichend ist. Die Folge ist Hypospadie als Mißbildung. Die weiblichen Individuen zeigen sichtbare Vermännlichung durch Klitorishypertrophie und Fusion der großen Labien, wobei das Orificium urethrae an anatomisch normaler Position verbleibt.

Bei absolutem Defekt der 3 β -HSD tritt das klinische Bild des Salzverlustes in den Vordergrund, charakterisiert durch das eigentliche Fehlen der Cortisolmetaboliten.

Bei partiellem Defekt tritt das Bild des Pseudohermaphroditismus in den Vordergrund und klinisch zeigt sich ein ausgeglichener Salz - Wasser - Haushalt; im Urin erscheinen deutliche Mengen von Tetrahydrocortison ($= 3\alpha$, 17α , 21-trihydroxypregnane-11,20-dione). Die vorliegende Studie befaßt sich ausschließlich mit Knaben.

1.3.1 In den Jahren 1967 bis 73 sind an der Univ.-Kinderklinik München 321 Patienten wegen einer Hypospadie behandelt worden. Über die Verteilung entsprechend dem Schweregrad gibt Tabelle I Auskunft. Die Einteilung nach vier verschiedenen Stadien orientiert sich an der Lokalisation der Harnröhrenmündung. Der Meatus urethrae liegt proximal im Bereich der Glans = I.Grad, im Schaftbereich = II.Grad, am Skrotumansatz = III.Grad, im Darmbereich = IV.Grad.

Tabelle I Häufigkeitsverteilung der 1967-73 behandelten Hypospadien

Grad	Anzahl	%
I.	145	44
II.	121	37
III.	46	14
IV.	14	4

Für die klinischen und biochemischen Untersuchungen wurden die Patienten mit Hypospadie III. und IV. Grades ausgewählt und ambulant einbestellt. Das Kollektiv umfaßte 46 Patienten mit Hypospadie III. Grades und 14 Patienten mit Hypospadie IV. Grades. Insgesamt wurden 60 Patienten (=100%) untersucht, von denen 28 (=46%) wegen zusätzlicher Krankheiten oder Fehlbildungen auffielen. Einige besaßen mehrere Fehlbildungen gleichzeitig. Tabelle II zeigt die Häufigkeit dieser Krankheiten.

Tabelle II Andere Krankheiten und Mißbildungen bei Hypospadie-Patienten

Retentio testis	16	(26%)
Leistenhernie	7	(11%)
Hermaphroditismus verus	1	(1%)
Gynäkomastie	3	(5%)
Hydrocele testis	2	(3%)
Analatresie	1	(1%)
Herzvitium	1	(1%)
Spalte des weichen Gaumens	1	(1%)
Virgapalmata	1	(1%)
Sonstiges	4	(6%)

1.3.2 Diesen Hypospadie-Patienten wurde ein Kontroll-Kollektiv von 44 gesunden Probanden gegenübergestellt

bestehend aus 24 Internatsschülern im Alter zwischen 10 und 16 Jahren und 20 Patienten aus der Univ.-Kinderklinik (chirurg. Abtlg.). Bei den Klinik-Probanden handelte es sich stets um Rekonvaleszenten kurz vor der Entlassung. Patienten mit endokrinen Erkrankungen, Lebererkrankungen, Nierenerkrankungen oder schweren chronischen Leiden finden sich nicht in diesem Kollektiv. Sie alle wurden klinisch und biochemisch untersucht. Da viele spezifische und unspezifische Faktoren einen Einfluß auf die Gesamtausscheidung der Steroide und deren qualitative Verteilung haben, ist es kaum möglich, ein gleichmäßiges Kollektiv zu erhalten. So wiesen SACHAR et al. auf die Unterschiede in der Steroidausscheidung zwischen hospitalisierten und nicht hospitalisierten Patienten hin. Um die eliminierbaren Unterschiede möglichst klein zu halten, wurden 24 Internatsschüler am gleichen Tag klinisch untersucht und im gleichen Zeitraum unter optimierten Bedingungen 24-Stunden-Urin gesammelt, der gaschromatographisch ebenfalls auf Δ^5 -Steroide untersucht wurde.

Das Vergleichskollektiv war notwendig

- (1) um die angewandte Analysentechnik hinsichtlich ihrer Trennschärfe mit denen anderer Autoren vergleichen zu können
- (2) um pathologische Hormonausscheidungen interpretieren zu können.

1.4 Die Auswertung der Versuchsergebnisse soll zeigen, ob und wie häufig sich ein 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Isomerase-Defekt in dem ausgewählten Hypospadie-Kollektiv vorkommt, der eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer Hypospadie spielt. Aus dem Anstiegsverhalten der beiden charakteristischen Steroidmetaboliten, DHA und Pregnentriol, sollen Rückschlüsse hinsichtlich eines partiellen bzw. absoluten Enzymdefektes gezogen werden.

2.0 MATERIAL UND METHODEN

2.1.1

Synacthen^R (z.B. CIBA)

HCG (z.B. ORGANON)

β -Glucuronidase/Arylsulfatase (z.B. BOEHRINGER,
Chloroform (z.B. MERCK, Art. 2445) Art. 15427)

Salzsäure in 2 n Lösung

Natriumhydroxid in 10% Lösung

Diäthyläther (z.B. MERCK, Art. 921)

Natriumcarbonat-10-hydrat krist. (z.B. MERCK,
Benzol (z.B. MERCK, Art. 1783) Art. 6391)

Kieselgel 100 standart. (z.B. MERCK, Art. 10184)

Natriumsulfat (z.B. MERCK, Art. 6649)

Selecta Faltenfilter $\varnothing$ 18,5 cm (z.B. Schleicher &
Äthanol absolut (z.B. MERCK, Art. 972) Schüll)

Seesand (mit Säure gereinigt u. geglüht) (MERCK, 7712)

MSTFA = N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
(z.B. MACHEREY-NAGEL & Co)

iso-Octan (z.B. MERCK, Art. 4727)

Essigsäureäthylester (z.B. MERCK, Art. 9623)

MERCKO FIX (z.B. MERCK, Art. 3970)

alle Reagenzien p.a. (soweit nicht anders angegeben)

A $\hat{=}$ Androsteron $\hat{=}$ 3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-on
(z.B. SCHERING)

E $\hat{=}$ Ätiocholanolon $\hat{=}$ 3 α -Hydroxy-5 β -androstan-17-on
(z.B. SCHERING)

D $\hat{=}$ Dehydroepiandrosteron $\hat{=}$ 3 β -Hydroxy-androst-5-en-
17-on (z.B. SCHERING)

11-O-Andr $\hat{=}$ 11-Keto-androsteron $\hat{=}$ 3 α -Hydroxy-5 α -
androstan-11,17-dion (z.B. SCHERING)

Δ -triol $\hat{=}$ Pregnentriol $\hat{=}$ 5-Pregnen-3 β ,17 α ,20 α -triol
(z.B. SCHERING)

Methylandrostenolon $\hat{=}$ 17 β -Hydroxy-1-methyl-5 α -androst-
-1-en-3-on (z.B. SCHERING)

Standardlösungen: je 20 mg A , E , D , 11-O-Andr,
A-triol, jeweils in Äthanol
ad 20,0 ml

Innerer Standard: 10 mg Methylandrosthenolon in
Äthanol ad 10,0 ml

Na-Acetat Puffer: 2,04g CH_3COOH
136,1g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot \text{H}_2\text{O}$
Aq.dest. ad 1000 ml

2.1.2

pH-Meter (z.B. BECKMANN)

Rotationsverdampfer

Wärmeschrank (z.B. HERAEUS)

Heizblock

Hamilton Mikrospritze 10 μl , auf 0,1 μl graduiert)

Gaschromatograph Typ - VARIAN 2100

Typ - PACKARD 842

2.1.3

Stickstoff (nachgereinigt)

Stickstoff (technisch)

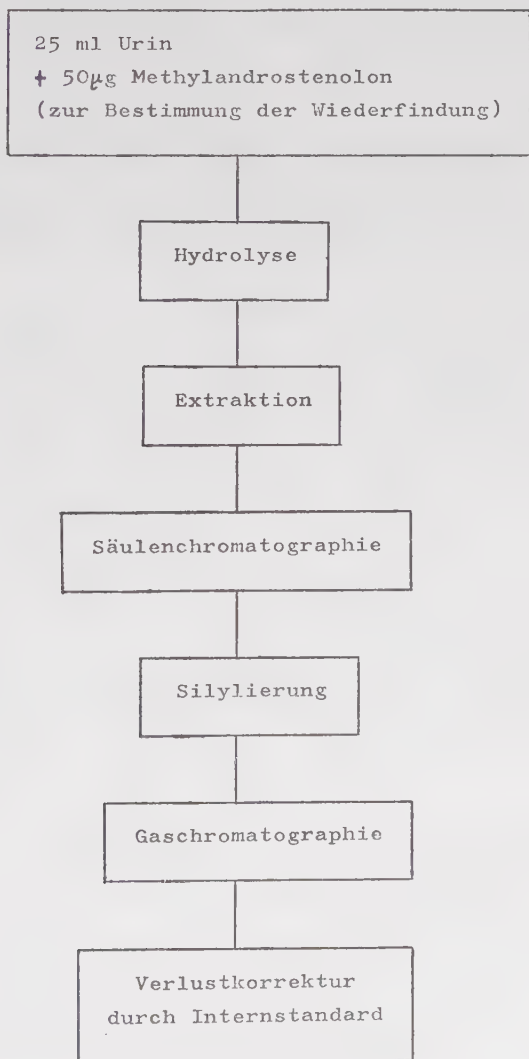
Wasserstoff

Preßluft

} zur Gas-Chromatographie

* Ein Teil des Enzymgemisches β -Glucuronidase-Arylsulfatase wurde uns von Fa. BOEHRINGER, Ma. freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Schematische Darstellung der gaschromatographischen
Bestimmung eines Steroidhormons aus Urin



2.2 Darstellung des Analysenganges (11,14,28,31,32)

2.2.1 Die Untersuchungen wurden an 24-Std.-Harnen durchgeführt. Um korrektes Harn-Sammeln bei den Patienten zu erreichen, wurde ihnen folgende Anleitung zur Hand gegeben:

Voraussetzung für zuverlässige Ergebnisse von Untersuchungsbestimmungen ist das exakte Sammeln des Urins während der gesamten Zeit von 24 Stunden. Bei Schulkindern ist es empfehlenswert, von Sonntagmorgen 7 Uhr bis Montagmorgen zu sammeln, da erfahrungsgemäß während der Schulzeit der Urin nicht gesammelt werden kann.

Folgende Punkte sind zu beachten:

1. Am Sonntagmorgen um 7 Uhr wird die Blase vollständig entleert. Diese erste Urinprobe wird noch nicht in die Sammelflasche gegeben. Erst danach müssen alle folgenden Urinportionen in der dazu bestimmten Flasche sorgfältig während des ganzen Tages und auch während der Nacht gesammelt werden. Auch vor jeder Stuhlentleerung muß unbedingt die Blase entleert werden und der Harn in die Sammelflasche gegeben werden.
2. Dieses Sammeln wird bis Montagmorgen 7 Uhr durchgeführt.
3. Um 7 Uhr am Montagmorgen wird die Blase nochmals vollständig entleert und der Urin in die Sammelflasche gegeben.
4. Während der Sammelperiode ist der Urin in der hierfür bestimmten Flasche aufzubewahren, an einem kühlen, schattigen Ort abzustellen und die gesamte Menge möglichst umgehend in die Klinik zu bringen bzw. zu schicken.

Vor seiner Benutzung kommt in das Sammelgefäß zur Stabilisierung des pH-Wertes ein Essigsäure-Natriumacetat-Puffer von ca. 1/10tel der zu erwartenden Harnmenge. Der Natriumacetatpuffer wird mit konzentrierter Essigsäure auf $\text{pH} = 4 - 4,5$ gebracht. Nach dem Sammeln wird die ausgeschiedene Harnmenge gemessen und im Kühlschrank bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ bis zur Untersuchung aufbewahrt.

2.2.2 Hydrolyse (3,31)

Der 24-Std.-Urinmenge werden 25 ml Urin entnommen und der Analyse zugeführt.

- 50 μ s Methylandrostenolon als Internstandard zu-
setzen und durch den ganzen Analysengang
mitführen (s.u.)
- 25 ml Urin mit 2 n HCl bzw. 10% NaOH auf pH=6,1
einstellen
- 10 ml Acetatpuffer pH=6,15
- 0,1 ml Chloroform als Konservierungsmittel, um
bakt. Zersetzung zu vermeiden
- 0,3 ml β -Glucuronidase/Arylsulfatase (=25000 E.Glu-
curonidase + 15000 E.Arylsulfatase; nach
BLUNCK) zugeben und bei 37°C 24 Std. inkubieren. Danach Probe auf pH=4,5 mit 2n HCl
einstellen + 0,3 ml Glucuronidase/Arylsulfatase (s.o.) dazugeben und bei 37°C weitere
24 Std. inkubieren. Die pH-Änderung ist notwendig, da bei verschiedenen H^+ -Konzentrationen die Aktivität der beiden Enzyme am höchsten ist.

Bestimmte Hydroxylgruppen befähigen die Steroide zur Konjugation an Schwefelsäure oder Glucuronsäure. Die Konjugation mit Schwefelsäure ist eine Veresterung; die Konjugation mit Glucuronsäure ist eine β -glykosidische Verbindung. Konjugierte Steroide sind im allgemeinen inaktiv besser wasserlöslich und harnfähig als unkongugierte Steroide.

Die enzymatische Spaltung der Steroidkonjugate mit dem Glucuronidase/Arylsulfatase-Gemisch aus dem Verdauungssaft von Weinbergschnecken (*Helix promatia*) war daher notwendig, um alle Glucuronoside und sulfatveresterten Steroide der Harnmetaboliten DHA und Pregnentriol in freier unveresteter Form zu erhalten (35,38,39).

Durch die Arylsulfatase aus *Helix promatia* werden

Steroidsulfate mit einer 3 α , 5 α -Konfiguration nicht gespalten (ROY 1965, JAYLE 1961). Zu diesen Verbindungen gehören u. a. Androsteron, 11-Keto-Androsteron (s. u.).

2.2.3 Um Emulsionsbildung wegen der α - und β -Sulfatasen des zugegebenen Enzymgemisches mit Di-äthyläther zu verhindern, werden v o r Beginn der Extraktion einige Körnchen PRADOSOL^R in den Scheidetrichter gegeben. Nach zweimaliger Extraktion des Hydrolysats mit 25 ml Diäthyläther je 3 min. im Scheidetrichter werden die vereinigten Extrakte g e w a s c h e n

1. mit 2 mal je 30 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung
2. mit 2 mal je 50 ml Aqua dest.

Trocknen des Ätherextraktes vor dem Eindampfen durch Filtration über Na₂SO₄ (wasserfrei) und Einengung zur Trockene am Rotationsverdampfer im Vakuum einer Wasserstrahlpumpe.

2.2.4 Säulenchromatographische Trennung auf Kieselgel (7,18,25)

In dem Extrakt befinden sich neben den interessierenden Steroiden all die anderen ausgeschiedenen aetherlöslichen Steroidmetaboliten, Farbstoffe und organische Substanzen, die bei der gaschromatographischen Analyse stören würden. Die interessierenden Substanzen werden mit einer säulenchromatographischen Trennungstechnik (s. u.) selektiv abgetrennt, aufgefangen und weiter behandelt. Als Säulenfüllmaterial dient das Kieselgel 100 mit Korngröße: 0,063 - 0,200 mm
70 - 230 mesh

deaktiviert nach BROCKMANN mit 5% H₂O

Säulenausgang mit einem feinen Glaswollpfropfen verschließen und mit einer Brise Seesand abdecken.

10 ml Benzol und 1g Kieselgel im dünnen Strahl in die Säule geben und ebenfalls mit einer Brise Seesand abdecken. (Lufteinschluß vermeiden!)

E l u t i o n s p l a n :

Fraktion I 10 ml Benzol - keine Steroide

Fraktion II 10 ml 0,5% Äthanol in Benzol

diese Fraktion enthält bereits Steroide, die jedoch für die Fragestellung (s.o.) nicht von Bedeutung sind.

Fraktion III 10 ml 4% Äthanol in Benzol

diese Fraktion enthält die interessierenden Steroide
Androsteron

Ätiocholanolon

Dehydroepiandrosteron

Pregnenetriol

11-Keto-Androsteron

Methylandrostenolon (Intern-
standard)

zu je 100%

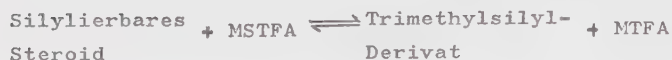
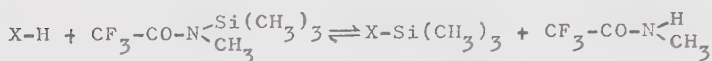
Trockenextrakt 3 mal in je 1 ml Benzol aufnehmen und auf die Säule geben. Mit 2 mal 5 ml Benzol nachwaschen (Fraktion I)

- a) 2 mal je 5 ml 0,5% Äthanol in Benzol durch die Säule vorlaufen lassen (Fraktion II). Dabei dürfen bei richtigem Arbeiten noch keine uns interessierenden Steroide in dieser Fraktion enthalten sein, was Überprüfungen von Zeit zu Zeit auch bestätigten.
- b) Die die gesuchten Steroide enthaltende Fraktion mit 10 ml 4% Äthanol in Benzol eluieren und zur Trockene einengen (Fraktion III)
- c) Die Fraktion III im Rotationsverdampfer zur Trockene eindampfen. 3 mal mit je 1 ml Essigsäureäthylester als Lösungsmittel die Steroide wieder aufnehmen und in ein Spitzröhrchen mit Schliffstopfen überführen. -- Lösungsmittel mit nachgereinigtem Stickstoff abblasen.

2.2.5 Silylierung der Probe (10,26)

Zur gaschromatographischen Darstellung wird der Trockenextrakt im Spitzröhrchen mit MSTFA=N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid silyliert, um die Steroide zu stabilisieren.

Die Reaktion läuft bei unseren Verbindungen zur rechten Seite folgender Reaktionsgleichung :



Zum gut getrockneten Steroidgemisch wird 0,1ml MSTFA hinzugefügt. Das Silyliergemisch wird eine Stunde inkubiert; anschließend das überschüssige Silylierreagenz mit nachgereinigtem Stickstoff abgeblasen. Trockenextrakt unverzüglich in iso-Oktan lösen, da die Trimethylsilyl-Derivate in kristallinem Zustand sehr instabil sind.

Die Proben wurden alle am Tag der Silylierung aufgespritzt.

2.2.6 Gaschromatographische Messung (21)

Trockenextrakt in 0,1 bzw 0,2 ml iso-Oktan gelöst 0,005 ml mit einer Hamilton Mikrospritze dem Gaschromatographen injiziert und gaschromatographiert. (Durch konstante Injektionstechnik kann die Fehlerbreite erheblich verringert werden.)

2.2.7 Die benötigten Referenzsubstanzen: A , E , D , Δ -triol, 11-O-Andro., M-Andro. wurden von den Firmen als Trockensubstanzen geliefert . Zur Herstellung einer Stammlösung werden 50 mg einer bestimmten Referenzsubstanz analytisch eingewogen und in Äthanol gelöst . Die Konzentration jeder Stammlösung beträgt 1 mg/ 1 ml .

Diese Stammlösungen werden luftdicht verschlossen im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt.

2.3.1 Sämtliche Chromatogramme sind unter folgenden Bedingungen aufgenommen:

Gerät VARIAN - FID
Trennsäule Ganzglassäule
Länge - 180 cm
Innerer Durchmesser - 2mm
Stationäre Phase 3% OV-225 auf Gas-Chrom Q
Trärgas techn. Stickstoff
Trärgasstrom 28 ml/ 1 min
Einspritzblocktemperatur. . 230 °C
Säulentemperatur 200 °C
Empfindlichkeit Abschwächung $1/64 \times 10^{-11}A$
Menge der injizierten Probe 3 - 5 μ l
Papiervorschub 10 inch/h

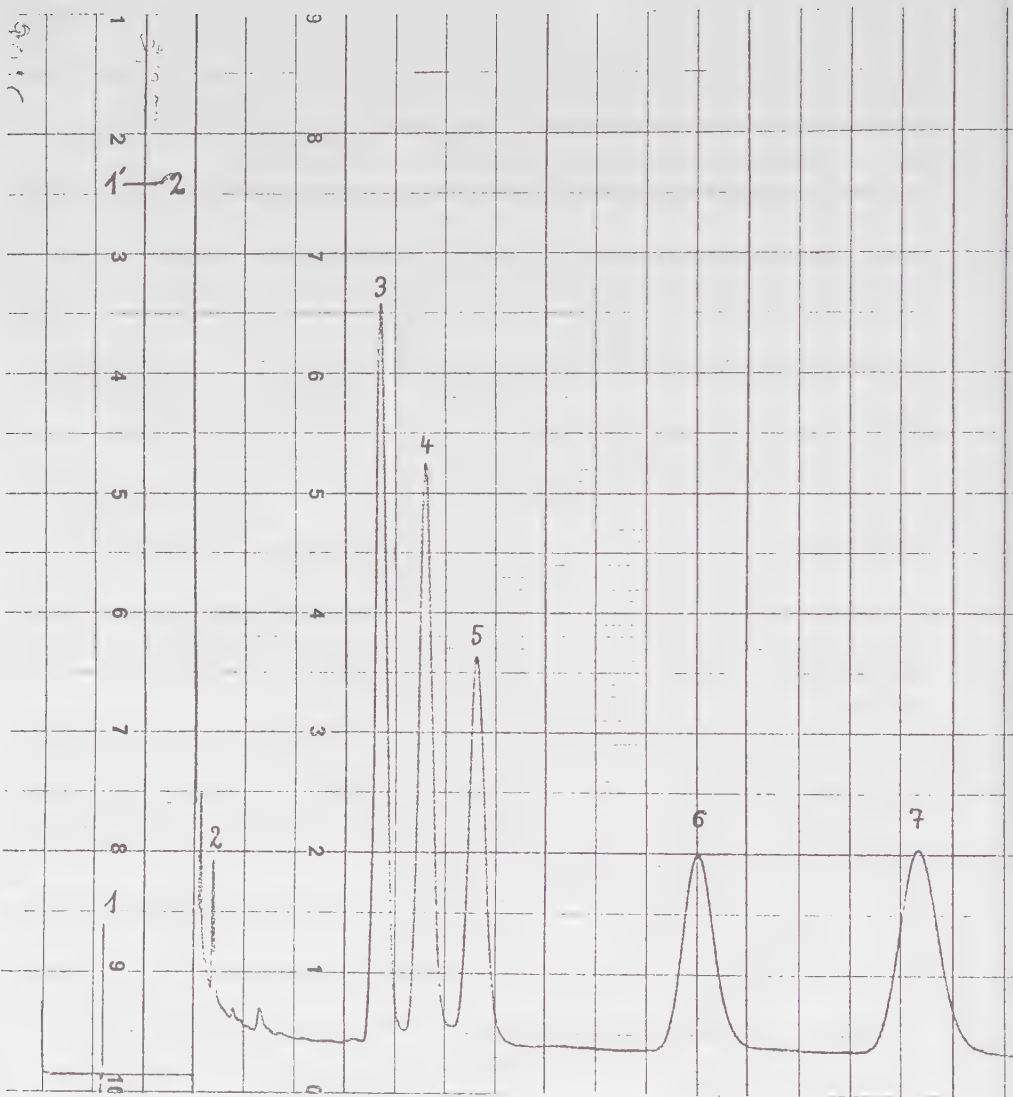


Abb. III zeigt ein Eichchromatogramm

- 1-2 - Lösungsmittelpeak
- 2 - unbekannter Peak
- 3 - Androsteron
- 4 - Aetiocholanolon
- 5 - Dehydroepiandrosteron
- 6 - 11-o-Androsteron/Pregnentriol
- 7 - Interner Standard (M-Androsteron)
- weitere Bedingungen für den GC s. 2.3.2
- Interpretation des Chromatogramms s. 2.3.2

2.3.2 Die geschriebenen Chromatogramme werden immer in derselben Art beschriftet (siehe Abb.III):

- 1 - Injektion
- 1' - Lösungsmittelpeak
- 2 - unbekannter Peak
- 3 - Androsteron
- 4 - Ätiocholanolon
- 5 - Dehydroepiandrosteron
- 6 - 11-O-Androsteron/Pregnentriol
- 7 - Interner Standard (= M-Androstenolon)

ad 1' - je nach dem Grad der Probenverunreinigung variiert die Stärke des Tailing am Lösungsmittelzacken

ad 2 - das Auftreten unerwünschter Peaks ist auf die Säulenchromatographie zurückzuführen, wo beim Auftrennvorgang verschiedene Steroide dieselbe Elutionszeit haben und mit dem benützten Sorptionsmittel nicht getrennt eluierbar sind.

ad 6 - dieser Peak beinhaltet zwei Steroide mit annähernd gleicher Retentionszeit, die auf der gaschromatographischen Säule mit der OV-225 Bepackung nicht auftrennbar sind.

Das Chromatogramm zeigt die von uns gesuchten Steroide, die in dem jeweiligen Urin als Sulfatester, als Glucuroniside und als freie Steroide ausgeschieden werden. Eine Ausnahme stelle Androsteron und 11-O-Androsteron dar; bei der Hydrolyse werden sie nicht durch Arylsulfatase gespalten und gelangen somit auch nicht zur gaschromatographischen Darstellung (ROY 1965). Bei dem von uns benutzten Enzymgemisch (Glucuronidase/Arylsulfatase) werden somit die Steroidsulfate mit einer $3\alpha, 5\alpha$ -Konfiguration nicht gespalten. Der Anteil der Steroidsulfate mit dieser Konfiguration beträgt ca. 100% und wird vernachlässigt.

2.3.3 Um die Steroidanalyse quantitativ auswerten zu können, ist ein Referenzchromatogramm erforderlich für sämtliche zu bestimmenden Steroide.

Präparation des Referenzsubstanzgemisches:

- 50 μg jedes Steroids wird als Standardsubstanz seiner Stammlösung entnommen und in ein Silyliergefäß abpipettiert;
- das Lösungsmittel mit nachgereinigtem Stickstoff abgeblasen;
- die kristallinen Substanzmengen mit 0,1 ml MSTFA silyliert, abgeblasen mit nachgereinigtem Stickstoff;
- in 0,2 ml iso-Oktan gelöst und 5 μl dem GC injiziert.

Das geschriebene Chromatogramm entspricht unserem Eichchromatogramm. Die Grundlinie des Eichchromatogramms ist sehr ruhig und kann ohne Mühe zu einer Geraden ausgezogen werden. Um die Peakhöhe des zu berechnenden Steroids zu erhalten, wird vom Maximum des Peaks das Lot auf die Grundlinie gefällt und die Höhe ausgemessen, die Vergleichswerte für die Mengenberechnung der zu bestimmenden Probe sind. Bei konstanter Retentionszeit wurde lediglich die Peakhöhe als Meßgröße herangezogen. Das Ausmessen erfolgt stets mit derselben Technik. Mit folgender Gleichung werden die jeweiligen Steroidmengen im 24 Std.-Harn errechnet:

$$\frac{\text{StM} \times \text{PH}_{\text{Probe}} \times \text{Lm} \times \text{Utm}}{\text{PH}_{\text{St}} \times \text{iM} \times \text{Ua}} = \text{Steroidmenge (mg/d)}$$

StM	= Standardmenge (μg)
PH _{Probe}	= Peakhöhe _{Probe} (mm)
Lm	= Lösungsmittelmenge (μl)
Utm	= Urintagesmenge (ml/d)
PH _{St}	= Peakhöhe _{Standard} (mm)
iM	= von der Probe injizierte Menge (μl)
Ua	= Menge des Urinansatzes (ml)

Die jeweils errechneten Steroidmengen werden mit Hilfe der Wiederfindung unseres Internstandards auf 100% korrigiert. Diese korrigierten Daten bilden die Basiswerte für die weitere Auswertung und Interpretation dieser Studie. Die Berechtigung zur Korrektur der gesuchten Hormonmetaboliten ist in der Tatsache zu suchen, daß in der Fraktion III sich alle gesuchten Steroide gleichartig verhalten.

2.4 Alle Patienten, bei denen die erste Harnanalyse eine deutlich erhöhte DHA-bzw. Pregnenetriol -Ausschüttung ergab, wurden nochmals zu zwei Stimulationstests einbestellt. Diese Tests sollten ermöglichen, daß

1. zwischen einer testiculären und einer adrenal bedingten Überproduktion von Androgenen
2. über eine mögliche Verteilung bestimmter Enzymmuster und damit Enzym -Defekte gemäß der Fragestellung entschieden werden kann.

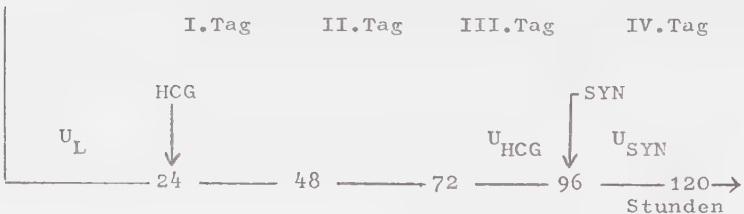
2.4.1 Die Stimulierung der testikulären Steroidsynthese erfolgt durch eine einmalige Injektion von 5000 I.E. HCG i.m. Der 24-Std.-Harn wurde am dritten Tag post injectionem gesammelt.

2.4.2 Die adrenale Steroidsynthese wurde durch eine einmalige Injektion von 0,25 mg Synacthen^R (=25 I.E. ACTH) i.v. stimuliert. Dabei handelt es sich um ein vollsynthetisch hergestelltes ACTH-Präparat, das die NNR stimuliert. Sofort nach der Injektion wurde der 24-Std.-Harn gesammelt.

Steigen während der jeweiligen Wirkungszeit dieser Stimulantien die Ausscheidungen der gesuchten Steroide DHA und Pregnentriol deutlich über den jeweiligen Normalbereich an, darf ein Enzymdefekt angenommen werden.

Die Ansprechbarkeit des Organismus auf die jeweiligen Stimulantien ist verschieden lang. Damit ändern sich auch die Zeitpunkte, ab denen 24-Std.-Harn gesammelt werden darf. Der Ablauf dieser Testreihe ist nachfolgend schematisch dargestellt.

Generell wurde vor dieser Testserie vom Patienten ein 24-Std.-Harn gesammelt, dessen Hormonausschüttungen als Leerwerte bzw. Orientierungswerte dienten.



2.5 Die umfangreiche Präparation der Harnsteroiden für den gaschromatographischen Nachweis macht eine Absicherung der Methode durch die statistische Qualitätskontrolle unumgänglich.

2.5.1 Die Präzision dieser quantitativen Bestimmungsmethode, d.h. die Erfassung der zufälligen Fehler, kann zahlenmäßig durch die Auswertung von Doppelbestimmungen berechnet werden. Die einfache Standardabweichung kann nach der Formel:

$$s = \sqrt{\frac{d_i^2}{2N}}$$

geschätzt werden; d_i bezeichnet die Variationsbreite der einzelnen Doppelbestimmungen; N die Anzahl der Doppelbestimmungen. Nach PEARSON errechnet sich dann der Variationskoeffizient nach der Formel:

$$V (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Die Genauigkeit der Steroidanalyse bei der vorliegenden Studie wurde aus 6 Doppelbestimmungen errechnet. Die Einzelwerte sind in Tab. 2.5.1 aufgeführt. Aus diesen Versuchen ergibt sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 6,05%. Die Präzision der Bestimmung der einzelnen Metaboliten ist unterschiedlich.

$V_A = 5,9\%$, $V_E = 2,2\%$, $V_{DHA} = 7,1\%$, $V_{\Delta\text{-triol}} = 9,0\%$

Tabelle 2.5.1: Doppelbestimmungen der gesuchten Steroidausscheidungen zur Errechnung des Variationskoeffizienten

VP	A	E	DHA	Δ-triol
4	17	55	43	41
	14	54	39	30
14	155	137	90	85
	125	131	81	71
28	150	183	21	113
	167	192	35	113
39	363	590	578	169
	400	645	605	208
48	930	500	36	149
	860	480	34	140
56	870	432	81	250
	850	423	76	180
V(%)	5,9	2,2	7,1	9,0

2.5.2 Die Richtigkeit der Ergebnisse wird durch Wiederauffindungsversuche ermittelt. Es werden in zwei völlig getrennten Arbeitsgängen die Wiederfindungen von fünf verschiedenen, zugesetzten Referenzsubstanzen geprüft. Zu Beginn der Harnanalyse werden einer bereits analysierten Urinprobe jeweils 0,2 mg der gesuchten Standardsteroidoide zugegeben und sämtlichen Analyseschritten unterzogen. Schließlich wird die jeweilige Wiederfindung am Chromatogramm errechnet. Tab. 2.5.2 zeigt die in zwei Ansätzen gewonnenen Wiederfindungsraten, die im Abstand von 10 Monaten durchgeführt wurden.

Die durchschnittliche Wiederauffindung beträgt 79%.
Um die Richtigkeit von diesen Analyseergebnissen
beurteilen zu können, wird das Richtigkeitsmaß
herangezogen.

$$\text{Richtigkeitsmaß} = \frac{\text{Zugesetzte Referenzsubstanz} - \text{Wiederfindungsrate}}{\text{Zugesetzte Referenzsubstanz}} \times 100$$

in %

Das Richtigkeitsmaß gibt die prozentuale Abweichung
der Wiederfindungsrate von der zugesetzten Referenz-
substanz an.

Proben-Bestimmungen mit einer Wiederfindung unter
60% werden nochmals neu angesetzt.

Tabelle 2.5.2

	Zuges. Menge in μg		Wiederfindung		% der zuges. Menge		Prozent	Richtigkeitsmaß in %
			I	II	I	II	I + II	
							2	
A	200	158	156	79	78		78,5	21
E	200	154	155	77	77,5	77		22,7
D	200	158	160	79	80		79,5	20,5
Δ -triol	200	166	167	83	83,5	83		16,8

2.5.3 Die Identität der Metaboliten Androsteron, Ätiocholanolon, Dehydroepiandrosteron und M-Androsteron ist durch ihr typisches gaschromatographisches Verhalten an einem Gaschromatographen (VARIAN) mit verschiedenen stationären Phasen sowie Trennsäulen-Längen gesichert.

Die Spezifität von Pregnentriol kann mit den obigen Verfahren nicht gesichert werden. Im Lauf der Arbeit ergab sich, daß Δ -triol und 11-O-Androsteron nicht getrennt werden. Konstante, minimale Abweichungen der Retentionszeit beim Vergleich der Referenzsubstanz mit der analogen Urinsubstanz von Pregnentriol erzwangen eine massenspektrographische Untersuchung der fraglichen Pregnentriol-Massen.

Die Bestimmung zeigt, daß es sich dabei um eine Mischung der Steroide Pregnentriol und 11-O-Androsteron handelt.

Die vorliegende Überlagerung der beiden Steroid-peaks wurde zu beheben versucht mit Hilfe der Methoxim - Bildung (nach FALES und LUUKAINEN) bzw. mit verschiedenen Silylierungsmethoden, konnte jedoch nicht behoben werden. Versuche mit anderen stationären Phasen am GC Typ VARIAN 2100 wären erforderlich gewesen, um die beiden Steroide trennen zu können. Dieser Schritt mußte unterbleiben, da die benutzten stationären Phasen für die Routineuntersuchungen unentbehrlich waren. Falls die Untersuchungsergebnisse es erfordern, wird dieser Punkt gesondert diskutiert.

3.0 UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

3.1.1 Die Untersuchungen wurden vergleichend am Normalkollektiv von 44 Personen sowie an 60 Hypospadie-Patienten durchgeführt. Aus der Population der registrierten Hypospadie-Patienten unserer chirurgischen Abteilung wurden jene Patienten mit der größten pathologischen Veränderung (Hypospadie III. und IV. Grades) klinisch und biochemisch untersucht. Damit wurde die Anzahl der Analysen zwar kleiner, doch aus folgenden Überlegungen heraus akzeptiert:

- (1) Theoretisch betrachtet müßte die Wahrscheinlichkeit, einen 3 β -ol-Dehydrogenase-Isomerase-Defekt zu finden, mit der Schwere der männlichen Differenzierungsstörung zunehmen.
- (2) Zum Nachweis eines Enzymdefektes und somit eines größeren Unterschiedes zwischen den einzelnen Ausscheidungen der Hormonmetaboliten genügen schon wenige Probanden.

Bei allen Patienten wurden klinisch folgende Größen gemessen: Körperoberfläche (Länge und Gewicht), Pubes und Crines (nach TANNER) und Testes mit Orchidometer. Die experimentellen Studien befaßten sich mit der Analyse des 24-Std.-Urins auf die Harnsteroid-Androsteron, Ätiocholanolon, Dehydroepiandrosteron und Pregnentriol. Einzelheiten der Methodik sind oben beschrieben. Die Gesamtzahl der Messungen, die als Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, betrug $n = 126$.

3.1.2 Um aus dem Ausfall der Harnsteroid-Bestimmungen von Hypospadie-Patienten diagnostische Schlüsse ziehen zu können, muß die Höhe dieser Werte in Beziehung zum Normalbereich der untersuchten Harnsteroid- gesetzt werden. Der Normalbereich soll repräsentativ sein für die gesunde Bevölkerung, die

jedoch ein unhomogenes Gemisch darstellt. Dieser Mißstand wird abgefangen durch Orientierung am Normalbereich homogener Klassen unter Berücksichtigung einiger Entwicklungsparameter: Alter, Körperoberfläche, Pubes, Crines.

Aufgrund der einheitlich erhobenen Befunde durch den gleichen Untersucher und der innerhalb der einzelnen Klassen in mehreren Parametern übereinstimmenden Patienten können die Hormonausscheidungen schon bei relativ kleinem Patientengut als objektiv und aussagekräftig angesehen werden.

3.1.3 Da sich die Ausscheidung der gesuchten Harnsteroides mit zunehmendem Alter quantitativ erheblich verschiebt und nicht für jedes Lebensjahr ein ausreichend großes Kollektiv untersucht werden konnte, war eine Einteilung in Altersklassen nötig, die homogene Klassen darstellen sollen. Den Altersklassen zugrunde gelegt wurde die von KNORR benutzte Einteilung:

Klasse	Zeitraum	Bezeichnung
I	1. - 6.L.J.	Kleinkind-u. Vorschulalter
II	7. -11.L.J.	Grundschulalter
III	12. -16.L.J.	gonadale Reifungsphase
IV	17.L.J.	Beginn der Maturität

In Tabelle 3.1.3 wurde neben der Klasse die Anzahl der Probanden, das mittlere chronologische Alter (Jahre), die mittlere Körperoberfläche (m^2) und Ausprägung der Pubes (Einteilung n. TANNER) angegeben.

Tabelle 3.1.3

VERGLEICHSKOLLEKTIV

Klasse	n	mittleres chron. Alter	mittlere Körper- oberfläche	Pubes
1. - 6.L.J.	11	4 1/12	0,67	I. ^o
7. -11.L.J.	10	8	0,89	I. ^o
12.-16.L.J.	17	13 9/12	1,45	II. ^o -IV. ^o
17. L.J.	6	16 5/12	1,65	IV. ^o

HYPOSPADIEKOLLEKTIV

1. - 6.L.J.	12	5 2/12	0,76	I. ^o
7. -11.L.J.	23	8 1/12	0,88	I. ^o = 20 II. ^o = 4
12.-16.L.J.	21	12 9/12	1,44	II. ^o -IV. ^o
17. L.J.	6	16 4/12	1,60	III. ^o -IV. ^o

Die erste Altersklasse (=I) beider Kollektive wurde stellvertretend für das "Kleinkind- und Vorschulalter" untersucht. Mit Pubes I.^o und Crines I.^o (nach TANNER), Testisvolumen zwischen 0,5 und 2,0 (mit Orchidometer bestimmt) sowie dem mittleren chron. Alter (4 1/12 Vgls.-Koll., 5 2/12 Hyp.-Koll.) und mittlerer Körperoberfläche (0,67 Vgls.-Koll., 0,76 Hyp.-Koll.) wurden Parameter bestimmt, die aussagekräftig die endokrine Situation beschreiben konnten.

In der zweiten Klasse (=II) wurden bei Crines I.^o bereits vier Probanden im Hypospadiekollektiv mit Pubes II.^o gesehen. Das Hodenvolumen variierte zwischen 0,5 und 8 ml, die mittlere Körperoberfläche

(0,89 Vgls.-Koll., 0,88 Hyp.-Koll.) und das mittlere chron. Alter (8 Vgls.-Koll., 8 1/12 Hyp.-Koll.) . Diese Befunde lassen sich dem "Grundschulalter" zuordnen.

In der dritten Altersklasse (=III) zeigten sich wesentliche Pubertätsmerkmale. Bei allen Knaben beider Kollektive war bereits axilläre Behaarung II.^o und III.^o (nach TANNER) sichtbar. Pubes lagen zwischen II.^o und IV.^o, das Hodenvolumen schwankte zwischen 7 bis 12 ml. Die mittlere Körperoberfläche und das mittlere chron. Alter erreichten für beide Kollektive die Werte 1,45 (m²) Vgls.-Koll. und 1,44 (m²) Hyp.-Koll. sowie 13 9/12 (Jahre) Vgls.-Koll. und 12 9/12 (Jahre) Hyp.-Koll. . Diese Klasse entspricht somit der Einteilung "gonadale Reifungsphase".

In der vierten Altersklasse (=IV) fanden sich bei sämtlichen Knaben Crines III.^o und IV.^o, Pubes III.^o und IV.^o, Testesvolumina zwischen 12 und 15 ml, mittlere Körperoberfläche von 1,65 (m²) Vgls.-Koll. und 1,6 (m²) Hyp.-Koll. und mittleres chron. Alter von 16 5/12 (Jahre) Vgls.-Koll. und 16 4/12 (Jahre) Hyp.-Koll. .

3.1.4 Beim Auswerten der Einzelergebnisse wurde innerhalb der jeweiligen Klassen beider Kollektive eine breite Streuung deutlich. Diese Tatsache war der Anlaß, den Median zu bestimmen und zu diskutieren, weil durch ihn nicht die ziffernmäßige Größe aller Einzelwerte zum Ausdruck kommt, sondern lediglich deren Größenanordnung, das heißt 50% aller Meßergebnisse sind kleiner, 50% größer als der Median. Somit bleibt er von den Ausreißern vollkommen unbeeinflusst. Standardabweichung und Variationskoeffizient wurden nicht ermittelt, da keine Normalverteilung in beiden Kollektiven vorlag. Um die Ursache für die breite Streuung aufzudecken, die zu den Unterschieden zwischen den quantitativen Merkmalen führten,

muß festgehalten werden, daß es praktisch unübersehbar viele gab, obwohl die Versuchsbedingungen so konstant wie möglich gehalten wurden. Die Streuung ist zu differenzieren

- (1) in methodische Streuung (z.B. durch Meßvorgang)
- (2) in biologische Streuung

ad (1) es wurde versucht, sie mit der Berechnung der zufälligen Fehler (Präzision, s. 2.5.1) und der systematischen Fehler (Richtigkeit, s. 2.5.2) zu erfassen; jedoch nicht Fehler z.B. durch die Art des Urinsammelns.

ad (2) Die biologische Streuung wird deutlich in der quantitativen Ergebnisvielfalt der Steroidhormonuntersuchungen. Sie ist z.B. abhängig von genetischen Faktoren oder Umweltfaktoren.

3.2.1 Die Einzelmeßwerte der Untersuchungen sind im Anhang aufgeführt. Zur Berechnung des Medians dienten die arithmetischen Mittel der jeweiligen Doppelbestimmungen der gesuchten Steroidmetaboliten. Tabelle 3.2.1 zeigt die Normalwerte der interessierenden Harnsteroiden bei Jungen in Abhängigkeit von chronologischen Altersklassen mit Angabe des Medians, des Streubereiches, der 10-90% Percentile (in Altersklasse IV wird der angenäherte Bereich angegeben), der prozentualen Ausscheidung des betreffenden Harnsteroids bezogen auf die errechnete Gesamtausscheidung der isolierten Steroidmetaboliten (A, E, D, Δ -triol, 11-O-Andro) und der Probandenanzahl.

Tabelle 3.2.1: Normalwerte

	A µg/d	E µg/d	DHA µg/d	Δ-triol µg/d
Altersklasse: 1. - 6. L.J.				
n = 11				
Median	79	36	21	99
Streu- bereich	(14 - 268)	(9 - 189)	(7 - 110)	(25-718)
10-90% Percent.	23 - 173	18 - 88	9 - 56	25-204
Prozent	33,6%	15,3%	8,9%	42,1%

Altersklasse: 7. -11. L.J.

n = 10				
Median	109	64	25	21
Streu- bereich	(33 - 206)	(27 - 229)	(0 - 68)	(0-933)
10-90% Percent.	39 - 178	33 - 129	12 - 51	0-129
Prozent	49,8%	29,2%	11,4%	9,6%

Altersklasse: 12.-16. L.J.

n = 17				
Median	486	413	59	180
Streu- bereich	(230 -2272)	(176-1478)	(24-736)	(0-384)
10-90% Percent.	317 -2100	200- 910	29-509	0-325
Prozent	42,7%	36,3%	5,2%	15,8%

Altersklasse: 17. L.J.

n = 6				
Median	1761	1476	112	195
Streu- bereich	(1474-4375)	(794-7635)	(69-217)	(97-824)
10-90% Percent.	1599-4375	1050-7635	73-217	130-824
Prozent	50%	41,7%	3,2%	5,5%



Abb.3.2.1 : Normalbereiche (10-90% Perzentile)
der vier untersuchten Harnsterioide

Abbildung 3.2.1 zeigt für jede einzelne Altersklasse die Normalbereiche der vier untersuchten Harnsteroid Androsteron, Aetiocholanolon, Dehydroepiandrosteron und Pregnentriol mit besonderer Kennzeichnung des Medians. Der Normalbereich ist durch die 10 - 90 % Percentile festgelegt, wobei für die Probandenanzahl einer jeden Klasse gilt: $10 < n < 20$.

In Altersklasse IV kann nur ein angenäherter Normalbereich angegeben werden, da die Probandenanzahl $n = 6$ beträgt.

Der semilogarithmische Maßstab zeigt auf der Ordinate die Logarithmen der täglichen Harnsteroidausscheidungen im 24.-Std.- Urin in $\mu\text{g/d}$ an, welche den entsprechenden Altersklassen auf der Abszisse zugeordnet sind.

3.2.2 Um die Aussagekraft der eigenen Normalwerte abschätzen zu können, wurden neben den Fehlerbetrachtungen noch Vergleiche mit in der Literatur angegebenen Daten angestellt, die nach ähnlichen Methoden chromatographisch bestimmt worden waren. Es wurden aus Publikationen, die jeweils in eine bestimmte Altersklasse einzuordnenden Werte zusammengefaßt und der errechnete Mittelwert neben Autor und Erscheinungsjahr in Tabelle 3.2.2 festgehalten.

Unter Berücksichtigung dieser zitierten Angaben sollen die eigenen Normalwerte diskutiert werden.

Tabelle 3.2.2: Ergebnisse der Harnsteroid-
fraktionierung in $\mu\text{g}/\text{die}$

Autor:	Alters- klasse	Andro	Aetio	DHA	Δ -triol 11-O- Andro	Preg- nen- triol
KNORR (1965)	I	120	67			
PC	II	314	178			
	III	1151	698			
	IV	2433	1692			
GLEIS- PACH (1970)	I	143	83	27	102	
GLC	II	233	156	55	116	
	III	797	147	147	242	
	IV	1850	2300	512	710	
TELLER (1967)	I			50		40
PC	II			130		120
	III			160		280
BLUNCK (1968)	I	65	56	15	11	
PC	II	162	142	47	13	
	III	1820	1685	218	58	
^{*)} STIPPIG (1975)	I	79	36	21		99
GLC	II	109	64	25		21
	III	486	413	59		180
	IV	1761	1476	112		195

^{*)} Die eigenen zitierten Daten entsprechen
Medianwerten.

3.2.3.1 Wertung der Androsteron-Ergebnisse

- (1) Die Medianwerte für Androsteron sind verglichen mit den Ergebnissen von KNORR und GLEISPACH um über 30 % niedriger. Sie kommen den Ergebnissen von BLUNCK am nächsten.
- (2) In der angegebenen 10-90 % Percentile der vorliegenden Daten befinden sich sämtliche Mittelwerte der zitierten Autoren.

3.2.3.2 Wertung der Aetiocholanolon-Ergebnisse

- (1) Die Medianwerte für Aetiocholanolon liegen wie die von Androsteron erheblich niedriger als die Mittelwerte von KNORR und GLEISPACH.
- (2) Die für die Altersklasse II von KNORR, GLEISPACH und BLUNCK zitierten Mittelwerte liegen außerhalb der 90% Percentile, werden aber vom eigenen Streubereich (Extremwerte) erfaßt.

3.2.3.3 Wertung der DHA -Ergebnisse

- (1) Der Medianwert für DHA liegt in allen vier Altersklassen verglichen mit den Mittelwerten von GLEISPACH, TELLER und BLUNCK bis zu 50% niedriger.
- (2) Die zitierten Mittelwerte von GLEISPACH, TELLER und BLUNCK für Altersklassen I, II und III liegen alle in der angegebenen 10-90% Percentile der eigenen Werte. Der von GLEISPACH für die Altersklasse IV zitierte Mittelwert liegt oberhalb der eigenen Normgrenze.
(GLEISPACH: 510 μ g/d für Altersklasse IV
STIPPIG : 217 μ g/d 90% Percentile für Altersklasse IV)
- (3) Der relative Anteil von DHA bezogen auf Altersklasse I nimmt mit zunehmendem Alter des untersuchten Normalkollektivs um 120%, 280% und 530% zu.

3.2.3.4 Wertung der Pregnentriol-Ergebnisse

- (1) Die in dieser Studie als ausgeschiedene Pregnentriolmengen angegebenen Werte sind Summenergebnisse für die Harnsteroido Pregnentriol und 11-Keto-Androsteron. Um einen Vergleich anstellen zu können, müssen die zitierten Werte für 11-O-Androsteron mit denen von Pregnentriol zusammengefaßt werden.
- (2) Die ermittelten Medianwerte dieser Studie liegen deutlich unter den Summenmittelwerten der zitierten Autoren.
- (3) Die Autorenwerte liegen in der zitierten 10 - 90 % Perzentile.

3.2.4 Die bei der Harnanalyse von 44 gesunden Probanden gefundenen 10-90% Perzentilen für die untersuchten Harnmetaboliten überlappen in fast allen Altersklassen die Mittelwerte der zitierten Autoren, was auf Grund der verschiedenen chromatographischen Methoden jedoch nur eine beschränkte Aussagekraft besitzt. Die Medianwerte sind quantitativ niedriger als ihre angegebenen Vergleichswerte (s. 3.1.5). Die Prozentuale Ausscheidung entspricht den Ergebnissen der aufgeführten Autoren.

DHA konnte in den ersten beiden Altersklassen zum Teil nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Methode erlaubte aber eine Auswertung auch sehr niedriger gaschromatographischer Peaks (s. 2.5) .

3.3 Zur Klärung der Frage, ob ein partieller bzw. totaler Enzymdefekt in dem untersuchten Hypospadiakollektiv vorliegt, wurden die Einzelwerte für DHA und Δ - triol mit den eigenen Normalwerten verglichen. Bei zweifelhaften Befunden wurden die Werte für Androsteron und Aetiocholanolon sowie die Reifungsparameter Pubes, Crines, Hodenvolumen und Körper-

oberfläche zur genaueren Beurteilung herangezogen.

3.3.1 In der folgenden Tabelle werden die Streubereiche (Extremwerte der interessierenden Harnsteroidwerte der Hypospadie-Patienten in Abhängigkeit von chronologischen Altersklassen aufgeführt und der 10-90% Percentile des Normalkollektivs gegenübergestellt, um jene Hypospadiiefälle aufzufinden, die herausfallen. Die Harnmetaboliten werden in $\mu\text{g/d}$ angegeben.

Tabelle 3.3.1

H: Streubereich des
Hypospadie-Kollektivs
N: 10-90% Percentile des
Normalkollektivs
n: Probandenzahl

Alters- klasse	A $\mu\text{g/d}$	E $\mu\text{g/d}$	DHA $\mu\text{g/d}$	Δ -triol $\mu\text{g/d}$
I				
H:n=12	(13- 161)	(0- 130)	(0- 96)	(0-367)
N:n=11	(23- 173)	(18- 88)	(9- 56)	(25-204)
II				
H:n=23	(15- 397)	(26- 476)	(0- 51,5)	(0-292)
N:n=10	(39- 178)	(33- 129)	(12- 51)	(0-129)
III				
H:n=21	(311-2810)	(238-3350)	(0-1445)	(0-325)
N:n=17	(317-2100)	(200- 910)	(29- 509)	(0-325)
IV				
H:n=6	(605-3765)	(427-2105)	(78- 607)	(0-313)
N:n=6	(1599-4375)	(1050-7635)	(73- 217)	(130-824)

3.3.2 Die Gruppe der untersuchten Hypospadie-Patienten zeigt eine vom chronolog. Alter und vom Reifegrad abhängige Zunahme der gesuchten Harnsterioide. Im Vergleich mit dem für das Kontrollkollektiv angegebenen Normalbereich, d.h. die 10-90% Percentile, fallen einige Hypospadie-Patienten heraus. Es interessieren bei dieser Studie jedoch nur jene Patienten, deren Hormonmetaboliten für DHA und Pregnentriol wesentlich über dem höchsten Wert der Normalgruppe liegen.

3.3.2.1 Wertung der Hormonmetaboliten in Altersklasse I

In Altersklasse I zeigen Hypospadie/Versuchsperson VP:5 und VP:6 auffällige Δ -triol-Werte, wobei die übrigen Metaboliten A, E, DHA im Normalbereich der 10-90% Percentile liegen. Im folgenden werden die Doppelbestimmungen für die Urinmetaboliten, der Normalbereich sowie der biologische Streubereich der Methode für das Normalkollektiv angegeben.

	A	E	DHA	Δ -triol
VP 5	26 28	56 63	7 10	357 378
VP 6	11 16	25 25	17 18	235 176
Normalbereich	(23-173)	(18- 88)	(9- 56)	(25-204)
Streubereich	(14-268)	(9-189)	(7-110)	(25-718)

Bei VP 5 und VP 6 liegen die Δ -triol-Werte außerhalb der 10-90% Percentile, aber innerhalb des bei den Urinalanalysen gefundenen Streubereiches. Damit übertreffen die gefundenen Werte nicht wesentlich die Altersnorm. Ihnen wird im weiteren Verlauf keine Beachtung geschenkt.

3.3.2.2 Wertung der Ergebnisse in Altersklasse II

Die Versuchspersonen 16, 17, 25 und 26 zeigen beachtenswerte Ergebnisse, die im folgenden unterstrichen dargestellt werden. Alle Daten sind in $\mu\text{g/d}$ angegeben.

	A $\mu\text{g/d}$	E $\mu\text{g/d}$	DHA $\mu\text{g/d}$	Δ -triol $\mu\text{g/d}$
VP 16	<u>270</u> <u>208</u>	<u>236</u> <u>187</u>	32 17	<u>197</u> <u>165</u>
VP 17	104 89	91 85	28 27	<u>249</u> <u>246</u>
VP 25	<u>215</u> <u>216</u>	113 110	Spur Spur	<u>194</u> <u>187</u>
VP 26	110 83	<u>189</u> <u>190</u>	Spur Spur	<u>147</u> <u>138</u>
Normalbereich	(39-178)	(33-129)	(12-51)	(0-129)
Streuungbereich	(33-206)	(27-229)	(0-68)	(0-933)

ad VP 16: Außer DHA fallen sämtliche untersuchten Harnsteroidoide aus dem Normalbereich und Streubereich der angegebenen Methode. Gegenüber der 90% Perzentile ist Δ -triol um 50%, Androsteron um 30% und Aetiocholanolon um 60% erhöht.

ad VP 17: Außer Δ -triol liegen die übrigen gesuchten Harnmetaboliten A, E und DHA im Normbereich. Δ -triol ist um 90% gegenüber der 90% Perzentile erhöht. Da der Patient jedoch einen völlig unauffälligen DHA-Urin-Spiegel zeigt, wird der Erhöhung um 90% des Δ -triol-Wertes keine Bedeutung beigemessen.

ad VP 25: Es wurden bei der Doppelbestimmung nur eine Spur DHA bei normalen Aetio-Werten gefunden, und neben einem um 20% erhöhten Andro-Wert weist dieser Patient einen um knapp 50% erhöhten Δ -triol-Wert auf. Diese Befunde sind für weitere Untersuchungen geringfügig.

ad VP 26: Bei unauffälligem Androsteron-Spiegel und einer Spur DHA finden sich ein um knapp 50% gegenüber der Norm erhöhter Aetio-Wert und ein um 10% erhöhter Pregnentriol-Wert. Weitere Untersuchungen wurden nicht unternommen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß wegen zu geringfügigen Erhöhungen der interessierenden Harnmetaboliten DHA und Δ -triol von weiteren Untersuchungen an diesen Versuchspersonen abgesehen wurde.

3.3.2.3 Wertung der Ergebnisse in Altersklasse III

Es finden sich bei VP 37 und VP 53 auffällig erhöhte Werte, die in $\mu\text{g/d}$ angegeben sind.

	A $\mu\text{g/d}$	E $\mu\text{g/d}$	DHA $\mu\text{g/d}$	Δ -triol $\mu\text{g/d}$
VP 37	562 610	386 415	700 945	237 244
VP 53	1830 1910	975 1130	1440 1450	Spur Spur
Normal- bereich	(317-2100)	(200- 910)	(29-509)	(0-325)
Streu- bereich	(230-2272)	(176-1478)	(24-736)	(0-384)

ad VP 37: Δ -triol sowie Andro und Aetio liegen im Normalbereich. DHA fällt im Mittelwert der Doppelbestimmung um 60%, mit einem Einzelwert um 85% aus dem Normalbereich. Dieser erhöhte DHA-Wert genügt, den Patienten weiteren Untersuchungen zuzuführen.

ad VP 53: Androsteron und Aetiocholanolon liegen im Normbereich. Δ -triol ließ sich nur in Spuren nachweisen. Dafür aber ist DHA um 280% erhöht, was Grund zu weiteren Untersuchungen war.

3.3.2.4 Wertung der Ergebnisse in Altersklasse IV

Hier finden sich keine Harnmetaboliten-Werte, die außerhalb der Norm liegen.

3.3.3 Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die ermittelten Hormonbefunde bei dem untersuchten Hypospadie-Kollektiv in einigen Fällen aus dem eigenen Normbereich fallen. Androsteron und Aetiocholanolon sind in Altersklasse I den zitierten Ergebnissen gleich und zeigen mit Beginn der endokrinen Aktivität der Gonaden den charakteristischen steilen Anstieg. Diese Befunde sprechen gegen das Vorliegen eines 3β -ol-Dehydrogenase- und Δ^4 ,5-Isomerase-Defektes, da dieses Enzym zur Synthese von Testosteron unerläßlich ist. DHA, das von Zwischenstufen - vor allem Pregnenolon und 17-Hydroxypregnenolon - stammt, liegt bei zwei Hypospadie-Patienten deutlich außerhalb des angegebenen Normalbereiches. Sie werden weiteren Untersuchungen zugeführt. Die Pregnentriol-Befunde fallen bei einigen Hypospadie-Patienten außerhalb des Normalbereiches, geben jedoch zu weiteren Untersuchungen keinen Anlaß. Die hinsichtlich ihrer Harnsteroidmuster auffälligen Hypospadie-Patienten 37 und 53 wurden von den obigen Betrachtungen ausgenommen. Sie wurden getrennt weiter untersucht (s. 3.4).

3.4.1 Da die Hypospadie-Versuchspersonen 37 und 53 auffällig erhöhte Harnsteroid-DHA und Versuchsperson 37 zusätzlich noch um 100% erhöhte Δ -triol-Werte hatten, und es offen war, ob der gesuchte Enzymmangel vorlag, wurden Stimulationsversuche durchgeführt.

Dabei wurde zugleich der Frage nachgegangen, inwieweit nur Testes oder auch die Nebennieren vom Enzymmangel betroffen sind. Vor Beginn der Stimulation wurde aus einem 24-Std.-Urin, den die Patienten einen Tag vor ambulanter Stimulation gesammelt hatten, ein Ausgangswert bestimmt (s. Tab. 3.4.2) .

Daran anschließend wurde zuerst das Leydigzellsystem stimuliert unter intramuskulärer Gabe von 5000 I.E. HCG. Ein 24-Std.-Urin wurde am dritten Tag post injectionem gesammelt (s. Schema 2.4.2) und ausgewertet (s. Tab. 3.4.2). Nach Ablauf dieser 72-stündigen Zeitspanne wurde die Nebennierenrinde des Patienten mit einem synthetischen ACTH-Präparat unter i.v. Gabe von 0,25 mg Synacthen^R stimuliert und sofort 24-Std.-Urin gesammelt. Die stimulierten Patienten bekamen eine neue Signatur (VP 37 -- 37', VP 53 -- 53'), da sich zwischenzeitlich seit ihrer ersten Untersuchung die Entwicklungsparameter (Hormone, Testes, Crines, Körperoberfläche) verändert hatten. In der Hypospadie-Statistik wurden sie nicht als neue Fälle geführt.

3.4.2 In Tabelle 3.4.2 werden die arithmetischen Mittel der jeweiligen Doppelbestimmungen der gesuchten Harnsteroid-DHA dargestellt. Der erste Ausgangswert lieferte den Grund zu den Stimulationsversuchen, die 6 Monate später durchgeführt wurden. Der zweite Ausgangswert verdeutlicht als Basiswert die momentane endokrine Situation, in welcher sich der Testpatient befand.

In Klammer stehen die Befunde, die den ersten Ausgangswert klinisch beschreiben.

Versuchsperson 37: Alter - 12 1/12 (11 8/12) Jahre
 Körperoberfläche - 1,38 (1,33)m²
 Testes - 4/4 (2/2) ml
 Pubes - II.^o(II.^o)
 Crines - I.^o(I.^o)
 bds. Gynäkomastie
 unauffällige F.A.

Versuchsperson 53: Alter - 15 9/12 (15 3/12) Jahre
 Körperoberfläche - 1,49 (1,47)m²
 Testes - 15/15 (10/10) ml
 Pubes - IV.^o(IV.^o)
 Crines - III.^o(III.^o)
 bds. Gynäkomastie
 unauffällige F.A.

Tabelle 3.4.2: Verhalten der Harnsteroido (Mittelwerte der Doppelbestimmungen) unter kurzfristiger HCG- und Synacthen^R-Stimulation.

VP 37'	A	E (in µg pro 24 Std.)	DHA	Δ-triol
1. Ausgangswert	586	400	822	240
2. Ausgangswert	794	555	1415	325
24-Std.-Urin				
72 Std. post injectionem von 5000 I.E. HCG i.m.	1030	670	1420	307
24 Std. sofort nach 0,25 mg Syn- acthen ^R i.v.	1175	785	1420	488

VP 53'	A	E	DHA	Δ -triol
	(in	μg pro	24 Std.)	
1. Ausgangswert	1871	1053	1445	0
2. Ausgangswert	1542	826	489	271
24-Std.-Urin				
72 Std. post				
injectionem von	4472	2054	743	434
5000 I.E. Syn-				
acthen ^R i.v.				
24 Std. sofort				
nach 0,25 _R mg	4824	2584	873	537
Synacthen ^R i.v.				

3.4.3 Bei Versuchsperson 37' änderten sich die Ergebnisse für Androsteron und Aetiocholanolon innerhalb von 5 Monaten nicht wesentlich. Die Steigerung dieser Harnsteroido verdeutlicht die in diesem Alter typische endokrine Aktivitätszunahme. --

Deutlichere Ergebnisse zeigte die DHA Ausscheidung. Sie nahm gegenüber dem ersten Ausgangswert um über 70% zu. Im Vergleich mit dem altersentsprechenden Normalwert (in $\mu\text{g}/\text{die}$: Median = 59; 90% Percentile im Normalbereich = 509; GLEISPACH $\bar{x}$ = 147; TELLER $\bar{x}$ = 160) wurde eine sehr deutliche Steigerung der DHA-Basal-exkretion beim 2. Ausgangswert festgestellt. Anders verhält es sich mit dem Substratmetaboliten Δ -triol. Hier konnte auch eine altersentsprechende Zunahme des Harnsteroids registriert werden. Im Vergleich mit dem entsprechenden Normalwert (in $\mu\text{g}/\text{die}$: Median=180; 90% Percentile im Normalbereich = 325; TELLER $\bar{x}$ = 280) liegt der 2. Ausgangswert zwar außerhalb des zitierten Mittelwertes und weit über dem eigenen Median, doch bildet er die obere Grenze der 10-90% Percentile (0-325 $\mu\text{g}/\text{d}$). Die Beziehung zwischen der Hormonausscheidung des nicht-stimulierten Patienten und des adrenal-stimulierten Patienten waren nicht sehr aus-

sagekräftig. Die 30% Zunahme der Androsteron-Ausschüttung und die 20% Steigerung des Harnsteroids Aetiocholanolon liegen für dieses Alter im Bereich der Norm. Beachtenswert ist dagegen die Konstanz der DHA- und Pregnentriol-Befunde. Sie schienen durch adrenale Stimulation nicht veränderbar, was einen auffälligen Befund darstellt; denn der DHA-Wert kann als ein wichtiger Index der NNR-Funktion angesehen werden. Die Hormonausscheidungen des nicht-stimulierten und des testiculär stimulierten Patienten wiesen ebenfalls keine auffälligen Unterschiede auf. Die 17-Ketosteroidausscheidung nahm um 8% zu, wobei der DHA-Befund unbeeinflusst erhöht blieb. Pregnentriol nahm um knapp 60% zu, lag aber immer noch im Normbereich der Altersklasse IV der eigenen Vergleichswerte (130 - 824 $\mu\text{g}/\text{die}$), in die durch die HCG-Stimulation die Versuchsperson versetzt wurde. Zusammenfassend kann für die VP 37' gesagt werden, daß die DHA-Sekretion durch Stimulation unbeeinflussbar, aber deutlich erhöht blieb. Allein der signifikant erhöhte DHA-Befund im Urin des Patienten genügt, um von einem partiellen 3 β -ol-Dehydrogenase- Δ 4,5-Isomerase-Defekt zu sprechen. Auf Grund des auch nach Stimulation unauffälligen Pregnentriolbefundes muß von einem sicheren Vorliegen eines partiellen Enzymdefektes Abstand genommen werden. Hierzu muß unbedingt ein signifikanter Anstieg des ebenso wichtigen Substratmetaboliten Δ -triol gefordert werden, der jedoch ausblieb.

3.4.4 Bei Versuchsperson 53' konnte innerhalb der 6 Monate, die zwischen den Hormonausscheidungen für Ausgangswert 1 und 2 lagen, keine Zunahme der endokrinen Aktivität festgestellt werden. Es zeigt sich sogar eine Abnahme bzgl. der Harnsteroidausscheidung, die möglicherweise auf einen zufälligen Fehler während der Analyse zurückgeführt werden kann. Die Befun-

de des 2. Ausgangswertes liegen noch im Streubereich des ersten.

Die adrenale und testikuläre Stimulation bei diesem Patienten hatte eine dreifache Zunahme der Harnsteroidausscheidung für Androsteron und Aetiocholanolon zur Folge, was für einen deutlichen glandotropen Stimulationseffekt spricht. Der Patient aus Altersklasse III befand sich in der "gonadalen Reifungsphase". Er war noch nicht erwachsen aber auch kein Kind mehr, weshalb die Stimulationsversuche nicht sehr deutliche quantitative Harnsteroidunterschiede vorwiesen. Die Stimulation des Leydigzellsystems mit HCG war um knapp 10% höher als die adrenale, was schon in Richtung Maturität zeigte.

DHA und Pregnentriol erfuhren nach Stimulation eine Ausscheidungszunahme. Der Vergleich mit der 90% Perzentile des Normalbereiches der Altersklasse IV, in die der Hypospadie-Patient durch die Stimulationstests versetzt wurde, zeigte:

DHA stieg nach Synacthen^R-Stimulation um 400 % (873 $\mu\text{g/d}$) gegenüber der Norm (73 - 217 $\mu\text{g/d}$) an.

Pregnentriol lag nach gleichartiger Stimulation mit 537 $\mu\text{g/d}$ im Normbereich (130 - 824 $\mu\text{g/d}$).

Der DHA - Anstieg um das Vierfache genügt, um als Ursache einen partiellen Enzymdefekt zu sehen.

Allerdings zwingt der im Normbereich liegende Pregnentriol-Wert den Interpreten, nur von einem **V e r d a c h t** auf einen partiellen 3 β -ol-DHG- Δ^4 ,5-Isomerase-Defekt zu sprechen.

4.0 BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Von BONGIOVANNI wurde 1962 ein Defekt der 3 β -ol-Dehydrogenase- Δ 4,5-Isomerase beschrieben. Hierbei ist nicht nur die Synthese des Cortisols, sondern auch die aller anderen Δ 4,3-Ketosteroide und der Östrogene stark eingeschränkt. Im Kap. 1.2 wurde ausführlich über den totalen Enzymdefekt gesprochen. Die meisten Patienten starben im Kleinkindalter an Salzverlustkrisen. Bisher sind 14 solche Fälle beschrieben worden. Anders verhält es sich bei einem partiellen Defekt an 3 β -ol-Dehydrogenase- Δ 4,5-Isomerase (s. 1.2.4). Es werden zu wenig Androgene gebildet. Dadurch kommt es zu einer partiellen Differenzierungsstörung, d.h. es werden zunächst die Differenzierungsvorgänge gestört sein, für deren Ablauf der reguläre Androgenspiegel Voraussetzung ist. Beim männlichen Geschlecht kommt es bei einem geringen Androgendefizit zu einer Hypospadie. Die in dieser Studie untersuchten 60 Patienten fanden sich in über 70% in der Vorpubertät bzw. Pubertät und hatten alle eine Hypospadie III.^o bzw IV.^o. Ihre Hypospadie war operativ korrigiert und subjektiv waren sie beschwerdefrei. Die eigenen Untersuchungen stützen sich auf die von 44 Personen gewonnenen Normalwerte. Die Grundlage jeder Methode zur Beurteilung patholog. Veränderungen ist eine ausreichende Zahl von Normalwerten, um Abweichungen von der Norm statistisch sichern zu können. Für die Beurteilung müssen diese Normalwerte ferner an einem gleichartigen Kollektiv gewonnen werden. Praktisch ist diese Forderung nicht zu verwirklichen wegen der großen physiologischen Schwankungsbreite der Einzelwerte innerhalb einer Altersklasse, der in jugendlichem

Alter noch hinzukommenden Altersabhängigkeit der Ausscheidung von Steroidmetaboliten und der durch den Aufwand der Methode bedingten begrenzten Zahl von Normalwerten. Die quantitativen Ergebnisse müssen sehr kritisch beurteilt werden.

Der mit der dargestellten Methode durchgeführte Suchtest nach einem partiellen 3 β -ol-Dehydrogenase- und Δ 4,5-Isomerase-Defekt an einem ausgewählten Patientenkollektiv mit Hypospadie III.^o und IV.^o ermittelte 2 Patienten mit auffälligen DHA-Werten. Die Hormonwerte der übrigen Hypospadie-Patienten stimmen mit denen der Vergleichsprobanden annähernd überein (vgl. 3.3.3).

Somit können diese übrigen Hypospadie-Patienten bzgl. der untersuchten Steroidmuster als normal angesehen werden.

1971 berichtet PARKS über einen Jungen im Pubertätsalter mit Hypospadie + sek. Geschlechtsmerkmalen + Gynäkomastie. Die klinischen Befunde erklärte er durch einen intrauterinen Testosterondefekt, der sich aus dem partiellen Enzymdefekt an der 3 β -ol-Dehydrogenase- Δ 4,5-Isomerase ergibt und welcher Ursache für Hypospadie und in der Pubertät für Gynäkomastie ist (13,16,17). Der Mechanismus dürfte wie im tierischen Experiment ablaufen, in welchem männliche Ratten mit intersexuellem Genitale und weiblicher Brustdrüsenanlage geboren wurden, nachdem in utero die 3 β -ol-Dehydrogenase und Δ 4,5-Isomerase gehemmt worden war (16). Mit der hier dargestellten Methode wurden 2 Jungen (VP 37 = 37^o und VP 53 = 53^o) gefunden mit deutlicher Erhöhung des Substratmetaboliten DHA, und bei VP 37 waren auch der Summenpeak der beiden Harnsterioide Pregnenatriol und 11-O-Androsteron um 100% gegenüber der Altersnorm erhöht. Zusammen mit dem Hypospadie- und Gynäkomastie-Befund deuteten die Erhöhungen der gesuchten Substratmetaboliten auf die

Möglichkeit eines partiellen Enzymdefektes hin. 1971 fand BONGIOVANNI mit gaschromatographischen Analyseverfahren (6) bei Patienten mit partiellem 3 β -ol-DHG- Δ 4,5-Isomerase-Defekt aus 24-Std.-Urin für Pregnentriol folgende Werte:

Alter (Jahre)	Altersklasse	Pregnentriol (in mg/d)
6	I	11
9 9/12	II	12,4
13	III	26,7

Pregnentriol-Werte der verdächtigen Hypospadien-Patienten dieser Studie:

12 1/12	III	0,325
13 9/12	III	0,271

Dieser Vergleich läßt deutlich werden, daß hinsichtlich dem Ausscheidungsmetaboliten Pregnentriol bei den gefundenen Personen kein totaler Enzymdefekt vorliegt. Der Sicherheit wegen wurden noch Stimulationsversuche mit HCG und Synacthen^R durchgeführt. Sie zeigten deutlich pathologische DHA-Befunde, die für einen partiellen 3 β -ol-Dehydrogenase- Δ 4,5-Isomerase-Defekt sprechen, wohingegen die Pregnentriol-Befunde nicht auf einen partiellen Enzymdefekt sowohl in der NNR als auch in den Gonaden hindeuten. (s. 3.4.3 und 3.4.4)

Es kann daher nur von einem V e r d a c h t auf einen partiellen Enzymdefekt gesprochen werden. Die bei beiden Patienten vorliegende Gynäkomastie braucht nicht unbedingt als Folge fehlender bzw. verminderter androgen wirksamer Substanzen angesehen werden; vielmehr kann sie durch die pathologische Östrogenbildung erklärt und als Überlauseffekt des

stark erhöhten DHA-Spiegels gedeutet werden. Bei beiden Patienten trat die Gynäkomastie erst in der Pubertät auf. Der DHA-Spiegel in der Vorpubertät dieser Patienten ist unbekannt.

Abschließend kann gesagt werden, daß die Methode ein qualitatives Verfahren darstellt, einen möglichen partiellen bzw. totalen Defekt der 3 β -ol-DHG- Δ 4,5-Isomerase herauszufinden.

Die vorliegenden Befunde lassen eine sichere Aussage nicht zu, wohl aber kann von einem Verdacht auf das Vorliegen eines partiellen Enzymdefektes bei beiden Hypospadie-Patienten gesprochen werden.

In der vorliegenden Studie konnte bei 321 Hypospadie-Patienten kein sicherer partieller oder totaler 3 β -ol-Dehydrogenase- Δ 4,5-Isomerase-Defekt gefunden werden. Diese Aussage stellt einen weiteren Beweis für die Seltenheit dieses partiellen oder totalen Enzymdefektes dar.

Die Mehrzahl der Fälle muß weiterhin als ätiologisch unklare idiopathische Form angesehen werden. Die Möglichkeit des temporären Enzymmangels in der Embryonalzeit, welcher sich später weitgehend ausgleicht (41), bleibt bestehen.

5.0 ZUSAMMENFASSUNG

Es wird in dieser Studie eine Methode zur Bestimmung von drei individuellen 17-Ketosteroiden und Pregnenatriol aus dem Urin beschrieben, um einen partiellen 3 β -ol-Dehydrogenase- und Δ 4,5-Isomerase-Defekt bei Hypospadie-Patienten herauszufinden. Die Untersuchungen wurden an 60 Patienten im Rahmen einer chirurg. Nachuntersuchung durchgeführt.

Nach einer Glucuronidase-Sulfatase-Hydrolyse wurde eine Extraktion der freigesetzten Steroide durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Abtrennung an Kieselgel 100 erfolgte die Silylierung und gaschromatographische Endbestimmung. Die Absolutwerte der einzelnen Metaboliten dieser Hormone wurden danach mit einem internen Standard berechnet. Die Zuverlässigkeitskriterien sind befriedigend.

Normalwerte für die Metaboliten wurden in vier Altersklassen bei 44 Probanden bestimmt. Es findet sich eine große Schwankung der verschiedenen Metabolitenausscheidungen. Im Vergleich mit den Mittelwerten anderer Untersucher weichen die angegebenen Medianwerte verschieden stark ab, der für jeden Harnmetaboliten angegebene Normbereich (= 10-90% Perzentile) umfaßt jedoch den jeweils zitierten Mittelwert. Zwei Knaben zeigten neben Hypospadie normale sek. Geschlechtsmerkmale kombiniert mit einer beidseitigen Gynäkomastie und auffällig erhöhten DHA-Werten im 24-Std.-Urin bei unauffälligen Pregnentriol-Werten. Stimulationsversuche mit HCG und Synacthen^R konnten die Diskrepanz bzgl. der Harnbefunde nicht beheben. Es muß bei beiden Hypospadie-Patienten von einem Verdacht auf einen partiellen 3 β -ol-DHG- Δ 4,5-Isomerase-Defekt gesprochen werden.

6.0 ANHANG

DATEN

I:= M-Androstenolon
 II:= Androstenolon
 III:= Ätiocholanolon
 IV:= Dehydroepiandrosteron
 V:= 4 - triol
 VI:= Alter
 Körperoberfläche
 VII:= Pubes
 Testes

KONTROLL-KOLLEKTIV:

n	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	66	12	8	20	186	8/12	I
	71	15	10	18	100	0,40	0,5/0,5
2	52	156	75	37	213	1 5/12	I
	57	189	68	16	195	0,45	0,5/0,5
3	55	265	162	20	670	4 1/12	I
	51	270	216	22	765	0,77	2/2
4	51	24	29	56	73	4 4/12	I
	51	25	29	56	73	0,69	2/2
5	77	67	86	17	26	4 4/12	I
	71	90	59	17	73	0,615	1/1
6	63	44	90	25	154	4 4/12	I
	53	49	85	15	153	0,68	2/2
7	83	61	36	31	25	4 10/12	I
	84	121	36	31	25	0,82	2/2
8	83	54	27	6	33	5	I
	85	49	25	8	27	0,83	1/1
9	83	61	36	31	25	5 1/12	I
	84	102	36	31	25	0,58	1/1
10	66	112	45	9	94	5 4/12	I
	69	120	38	9	104	0,805	2/2
11	69	23	17	110	95	5 6/12	I
	69	23	18	110	105	0,775	2/2
12	70	39	34	14	67	6	I
	74	27	32	9	54	0,765	1/1

n	I	II	III	IV	V	VI	VII
13	93 65	37 40	60 76	14 34	Spur Spur	7 0,81	I 2/2
14	56 57	171 115	65 55	31 20	Spur Spur	7 3/12 0,97	I 2/2
15	75 55	124 288	133 325	42 91	615 1250	7 5/12 0,915	I 0,5/1
16	82 75	181 78	130 127	34 67	124 133	7 6/12 0,90	I 1/1
17	72 71	60 62	631 58	19 25	21 21	8 3/12 0,88	I 1/1
18	69 71	110 105	45 39	41 48	Spur Spur	8 8/12 0,96	I 2/2
19	59 64	40 40	100 89	21 17	Spur Spur	8 11/12 0,835	I 0,5/0,5
20	61 58	179 177	65 78	Spur Spur	Spur Spur	8 10/12 0,795	I 1/1
21	77 77	105 115	27 27	32 49	78 77	10 6/12 1,16	I 2/2
22	90 54	1220 1220	670 680	242 240	314 262	11 5/12 1,55	III 8/8
23	68 74	310 273	226 208	61 56	134 124	11 9/12 1,26	II 4/3
24	85 82	382 379	341 354	142 177	229 177	11 11/12 1,45	III 12/12
25	57 50	445 472	205 194	38 43	Spur Spur	12 5/12 1,24	II 5/5
26	85 80	485 487	400 425	44 46	174 231	12 10/12 1,27	II 6/8
27	69 63	232 228	406 420	42 22	208 152	12 11/12 1,15	II 3/3
28	65 77	369 265	239 173	34 29	111 94	12 11/12 1,25	II 3/7
29	79 89	1380 1280	660 540	89 80	363 405	13 11/12 1,47	III 8/7
30	67 67	490 465	176 176	51 51	305 305	13 7/12 1,29	II 5/4
31	69 64	400 470	175 220	717 750	125 135	13 7/12 1,17	II 4/3
32	72 72	1500 1530	855 890	68 80	236 278	14 2/12 1,64	III 12/12

n	I	II	III	IV	V	VI	VII
33	50	420	450	129	218	14 8/12	III
	66	425	455	126	280	1,53	14/13
34	76	1450	660	30	Spur	15 4/12	III
	83	1510	670	28	Spur	1,64	13/13
35	77	505	317	24	69	15 4/12	III
	109	731	450	23	65	1,67	13/13
36	80	2060	910	21	Spur	15 5/12	IV
	73	2140	910	34	Spur	1,57	16/16
37	82	1210	490	330	Spur	15 8/12	IV
	70	1370	545	312	Spur	1,67	16/16
38	94	2200	1443	578	335	15 11/12	IV
	94	2344	1513	440	315	1,87	15/15
39	102	1589	1530	69	130	16 2/12	IV
	97	1609	1530	69	130	1,58	16/16
40	84	1490	1050	77	77	16 3/12	IV
	84	1458	1050	124	116	1,63	19/19
41	76	3760	1490	132	275	16 5/12	IV
	86	3640	1463	115	183	1,64	16/16
42	83	1710	778	53	223	16 8/12	IV
	93	1735	809	93	100	1,88	17/17
43	68	4550	2650	180	835	16 10/12	IV
	72	4200	2620	200	810	1,76	13/17
44	76	1815	1475	197	337	16 6/12	IV
	76	1780	1475	237	253	1,43	16/17

KOLLEKTIV DER HYPOSPADIE-PATIENTEN

1	80	42	Spur	Spur	Spur	4 1/12	I
	76	37	Spur	Spur	Spur	0,62	0,5/0,5
2	59	19	54	Spur	74	3 10/12	I
	75	21	56	Spur	73	0,58	0,5/0,5
3	80	20	37	Spur	18	4 10/12	I
	73	37	50	Spur	14	0,55	0,5/0,5
4	84	17	55	43	41	5 1/12	I
	92	14	54	39	30	0,58	2/ø
5	90	26	56	7	357	5 4/12	I
	81	28	63	10	378	0,66	0,5/0,5
6	93	11	25	17	235	5 4/12	I
	84	16	25	18	176	0,64	0,5/0,5
7	100	11	37	Spur	44	5 4/12	I
	107	15	37	Spur	54	0,79	2/1

n	I	II	III	IV	V	VI	VII
8	67 74	47 46	140 121	Spur Spur	177 158	5 3/12 0,84	I 0,5/0
9	73 77	40 27	34 43	26 22	152 105	5 4/12 0,64	I 0,5/0,5
10	86 83	155 168	84 85	11 12	110 120	5 8/12 0,80	I 0,5/1
11	95 82	16 19	54 51	11 10	39 52	5 10/12 0,71	I 0,5/1
12	88 81	25 27	51 48	10 10	84 91	5 11/12 0,95	I 2/2
13	82 87	56 73	54 47	34 31	73 63	6 3/12 0,59	I 0,5/0,5
14	76 80	155 125	137 131	90 81	85 71	6 7/12 0,88	I 1/1
15	82 83	125 122	96 95	9 9	69 54	6 8/12 0,94	I 3/2
16	80 79	270 208	236 187	32 17	197 165	6 8/12 0,77	I 0,5/0,5
17	90 91	104 89	91 85	28 27	249 246	6 9/12 0,82	I 0,5/0,5
18	98 89	107 120	54 48	7 8	51 67	6 10/12 0,75	I 1/1
19	104 87	37 38	47 48	7 16	70 50	6 11/12 0,81	I 0,5/0,5
20	85 79	191 167	100 92	27 21	59 67	6 11/12 0,94	I 0,5/0,5
21	78 88	88 84	57 49	5 5	46 41	7 2/12 0,82	I 1/1
22	92 97	68 63	49 33	41 55	32 70	7 3/12 0,87	I 1/0,5
23	83 83	17 14	28 24	5 4	38 28	7 5/12 0,87	I 1/1
24	76 78	107 104	45 42	55 47	114 113	7 10/12 0,76	I 0,5/0,5
25	86 97	215 216	113 110	Spur Spur	194 187	8 4/12 0,76	I 0,5/1
26	81 75	110 83	189 190	Spur Spur	147 138	8 6/12 0,94	I 1/0,5
27	89 78	126 132	93 110	13 20	121 123	8 7/12 0,95	I 1/2

n	I	II	III	IV	V	VI	VII
28	82 82	150 167	183 192	21 35	113 113	8 10/12 1,03	I 1/1
29	100 107	104 104	195 190	24 22	Spur Spur	9 5/12 0,94	I 1/1
30	64 78	215 214	222 218	70 34	70 84	9 8/12 0,70	II 2/1
31	80 76	192 180	188 182	43 44	74 Spur	9 10/12 0,95	I 1,5/1,5
32	100 81	170 173	92 101	26 28	90 95	9 10/12 1,10	II 3/3
33	98 80	395 400	615 530	55 45	120 95	10 6/12 1,06	II 3/3
34	95 77	122 142	92 101	21 20	134 165	10 9/12 1,18	I 3/3
35	59 61	49 48	50 55	53 50	Spur Spur	10 11/12 0,91	I 1/1
36	67 74	330 292	281 293	58 45	127 95	11 8/12 0,91	II 2/2
37	84 82	562 610	386 415	700 945	237 244	11 8/12 1,33	II 3/3
38	75 63	510 505	600 565	370 336	114 112	11 11/12 1,40	III 15/15
39	89 96	363 400	590 645	478 505	169 208	12 1,28	II 3/3
40	85 85	460 460	950 880	450 450	124 124	12 1,28	II 3/4
41	78 79	485 485	3340 3360	465 471	Spur Spur	12 0,93	III 10/10
42	91 81	2180 2400	1055 1120	55 45	192 216	12 2/12 1,50	III 7/7
43	94 100	2884 2737	1723 1636	101 94	193 181	12 2/12 1,57	III 10/12
44	74 70	1050 830	578 440	Spur Spur	Spur Spur	12 2/12 1,50	III 10/10
45	73 84	734 728	538 525	105 91	159 136	12 2/12 1,50	III 10/10
46	92 86	940 1010	389 405	367 381	184 229	12 11/12 1,33	II 4/3
47	84 88	1035 1110	238 238	21 20	107 102	13 1,57	III 10/10

n	I	II	III	IV	V	VI	VII
48	90 84	930 860	500 480	36 34	149 140	14 1,50	III 8/5
49	85 86	1700 1670	560 533	44 43	171 145	14 8/12 1,69	IV 15/15
50	87 100	2090 1350	1470 1380	94 91	285 207	14 11/12 1,78	IV ø/15
51	85 89	2200 1840	1600 1320	72 72	Spur Spur	15 1,33	IV 15/10
52	86 83	1251 1834	672 980	398 580	255 297	15 7/12 1,47	IV 10/10
53	70 75	1830 1910	975 1130	1440 1450	Spur Spur	15 3/12 1,47	IV 10/10
54	91 91	2090 2170	990 1100	93 93	Spur Spur	15 11/12 1,54	IV 15/15
55	74 64	690 520	1010 770	Spur Spur	Spur Spur	16 1,43	III 8/ø
56	97 95	870 850	432 423	81 76	250 180	16 1/12 1,28	III 12/10
57	100 85	3510 4020	1970 2240	150 230	Spur Spur	16 4/12 1,78	IV 15/15
58	94 66	2510 3190	1370 1670	223 250	Spur Spur	16 7/12 1,88	IV 10/15
59	94 94	1790 1830	1130 1150	122 139	95 90	16 8/12 1,5	IV 15/15
60	97 104	4050 1410	1415 720	240 174	312 315	16 8/12 1,70	IV 15/15

STIMULIERTES HYPOSPADIEKOLLEKTIV

37*	62 82	775 810	475 635	1450 1380	380 270	12 1/12 1,38	II 4/4
53*	70 75	1251 1834	672 980	398 580	255 297	15 9/12 1,4	IV 15/15

7.0 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) BJÖRKHEM, K. EINARSSON, J. - A. GUSTAFFSON:
3 β -Hydroxy- Δ^5 -C19- and C21-steroid
oxidoreduktase activity in rat liver
Steroids 19, 471 (1972)
- (2) BLUNCK, W.:
Die α -ketolische Cortisol- u. Corticosteron-
metaboliten sowie die 11-Oxy- u. 11-Desoxy-
-17 ketosteroide im Urin von Kindern
Acta endocrinologica - Suppl. 134 (1968)
- (3) BONGIOVANNI, A. M.:
Unusual steroid pattern in congenital
adrenal hyperplasia: deficiency of
3 β -hydroxy-dehydrogenase
J. Clin. Endocr. 21, 860 (1961)
- (4) BONGIOVANNI, A. M.:
The androgenital syndrom with deficiency
of 3 β -ol-dehydrogenase
J. clin. invest. 41, 2086 (1962)
- (5) BONGIOVANNI, A. M.; ROOT, A. W.:
The adrenogenital syndrome
New Engl. J. Med. 268, 1283 (1963)
- (6) BONGIOVANNI, A. M.; EBERLEIN, T. MOSHANG:
Urinary Excretion of Pregnanetriol and
 Δ^5 -Pregnenetriol in Two Forms of
Congenital Adrenal Hyperplasia
J. clin. invest. 50, 2751 (1971)
- (7) BROCKMANN, H. und H. SCHRODDER:
Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptions-
vermögen zur chromatographischen Adsorption
Chem. Ber. 74, 73 (1941)
- (8) COHEN, S. L., J. BITMAN:
Hydrolysis of Urinary Conjugated
17-Ketosteroids by Acetate Buffer
J. Biol. Chem. 191, 351 (1951)

- (9) DAVID, R.R.; C.BERGADA and C.J.MIGEON:
Bull Hopkins Hosp. 117,16 (1965)
- (10) DONIKE, M.:
N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacet-
amid, ein neues Silylierungsmittel aus der
Reihe der silylierten Amide
J. Chromatography, 42,103 (1969)
- (11) EIK-NES, K.B.; E.C.HORNING:
Gas Phase Chromatography of Steroids
- (12) FALES, H.M.; T.LUUKAINEN:
O-Methoxime and Hydrozinderivate
Anal. Chem. 37,955 (1965)
- (13) FEDERMAN, D.D.:
Abnormal Sexual Development
W.B. Saunders Co., Philadelphia, 119 (1967)
- (14) GLEISPACH, H.:
Gas-chromatographische Bestimmung von
Steroidhormonen aus dem Harn
Angewandte Chromatographie 12 (1969)
- (15) GLEISPACH, BERGER, FINK, FRITZ, HEIDEMANN und
WOLF:
Normal values for the various 17-oxosteroids
Z.Klin. Chem. u. klin. Biochem. 18,4 (1970)
- (16) GOLDMAN, A.S., A.M.BONGIOVANNI, W.C.YAKOVAC:
Production of Congenital Adrenal Cortical
Hyperplasia, Hypospadias and Clitoral Hyper-
trophy (Adrenogenital Syndrome) in Rats by
Inactivation of 3 β -Hydroxysteroid-Dehydroge-
nase
J.Clin. Endocrin. 24,894 (1964)
- (17) GOLDMAN, A.S., W.C. YADOVAC, A.M.BONGIOVANNI:
Development of Activity of 3 β -Hydroxysteroid
Dehydrogenase in Human Fetal Tissues and in
Two Anencephalic Newborns
J.Clin.Endocr. 26,14 (1966)

- (18) HALPAAP, H.:
Charakterisierung von Kieselgelen nach
Porensystem und Aktivität
J. Chromatography 78, 63-75 (1973)
- (19) JÄNNE, O., PERHEENTUPA and R. VIHKO:
Plasma and urinary steroids in an eight-
year-old boy with 3 β -hydroxysteroid
dehydrogenase deficiency
J. Clin. Endocr. 31, 162 (1970)
- (20) JÄNNE, O., PERHEENTUPA, L. VIINIKKA, R. VIHKO:
Testicular Endocrine Function in a Pubertal
Boy with 3 β -ol-Dehydrogenase Deficiency
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 184 (1974)
- (21) KAISER, R.:
Chromatographie in der Gasphase Bd. I) Bd. V)
B. J. Hochschultaschenbücher Mannheim 1973
- (22) KENNY, F. M., J. W. REYNOLDS and O. C. GREEN:
Program and Abstracts, 40th Annual Meeting,
Society of Pediatric Research,
Atlantic City, 1971
- (23) KNORR, D.:
in: Fortschritte der Paedologie
LINNEWEH, F. (ed)
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 109 (1965)
- (24) KNORR, D., BIDLINGMAIER, O. BUTENANDT, D. ENGELHARDT:
Reifenstein's syndrome, a 17 β -hydroxysteroid-
oxyreductase deficiency
Acta endocr. (Kbh) Suppl. 173, 37 (1973)
- (25) Trennmethode im Labor von Prof. KNORR
entwickelt
- (26) mündliche Mitteilung von Prof. KNORR
- (27) LABHART, A.:
Klinik der inneren Sekretion
Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1971

- (28) LEHNERT, G., W. MÜCKE, H. VALENTIN:
Über eine Methode zur gas-chromatographischen
Analyse von 11-Desoxy-17-Ketosteroiden im
Harn und ihre Ergebnisse beim Menschen
Endokrinologie, 46, 241 (1964)
- (29) LEIBER, B., G. OLBRICH:
Die klinischen Symptome
Verlag Urban & Schwarzenberg, 5. Auflage 1973
- (30) NEHER, R., A. WETTSTEIN:
Occurrence of Δ 5-3 β -Hydroxysteroids in
adrenal and testicular tissue
Acta endocr. (Kbh) 35, 1 (1960)
- (31) NEHER, R.:
Steroid Chromatography
Elsevier Amsterdam London-New York (1964)
- (32) OERTEL, G. W.:
Chemische Bestimmungen von Steroiden im
menschlichen Harn
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964
- (33) PARKS, G. A., J. A. BERMUDEZ, A. S. ANAST,
A. M. BONGIOVANNI and M. J. NEW:
Pubertal Boy with 3 β -Hydroxysteroid
Dehydrogenase Defekt
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 269 (1971)
- (34) SAMUELS, L. T., UCHIKAWA:
Biosynthesis of adrenal steroids
in: A. B. EISENSTEIN (ed): The adrenal cortex
Boston: Little, Brown & Co 61
- (35) STAIB, W., W. TELLER and H. SCHARF:
Über die Ausscheidung von 17-Ketosteroid-
sulfaten und -glucuroniden im menschlichen
Harn
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 318, 163 (1960)

- (36) TANNER, J.M.:
Growth and adolescence
Oxford: Backwell (1962)
- (37) TELLER, RAUE, PAL:
The excretion of Δ^5 -pregnenetriol in
children of various ages
Acta Paediat. Scand. 62, 85 (1972)
- (38) VENNING, E.H., HOFFMANN, M.M. and J.S.L. BROWNE:
Isolation of Androsteron Sulfate
J. biol. Chem. 146, 369 (1942)
- (39) WEST, C.D., H. REICH and L.T. SAMUELS:
Urinary Metabolites after intravenous
injection of human subjects with Testosterone
J. biol. Chem 193, 219 (1951)
- (40) ZACHMANN, M., J.A. VOLLMIN, G. MURSET, H.CH. CURTIUS
and A. PRADER:
Unusual type of congenital adrenal hyperplasia
probably due to deficiency of 3 β -hydroxy-
steroid dehydrogenase. Case report of a survi -
ving girl and steroid studies.
J. Clin. Endocr. 30, 719 (1970)
- (41) KENNY, F.M., J.W. REYNOLDS and O.C. GREEN :
Partial 3 β Hydroxysteroid Dehydrogenase
(3 β -HSD) Deficiency in a Family with Con-
genital adrenal Hyperplasia: Evidence for
Increasing 3 β -HSD Activity with Age
Paediatrics 48, 5 (1971)

Lebenslauf

30. Juli 1948 geboren in Ettlingen
Vater: Georg STIPPIG
Mutter: Maria STIPPIG, geb. BADER

1955 Volksschule in Malsch

1959 Ludwig Wilhelm-Gymnasium in Rastatt

1967 Abitur am humanistischen Zweig

1967 Studium der Physik an der
TU-Karlsruhe

1970 Vordiplom in Physik

1970 Beginn des Medizin-Studiums an
der Universität München

1972 Ärztliche Vorprüfung

1973 Aufnahme der wissenschaftlichen
Arbeit im Hormonlabor der Univ.-
Kinderklinik

1975 Ärztliche Staatsprüfung an der
Universität in München

